N° d'ordre :

THESE

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir le grade de

Docteur ès-Sciences Physiques

par

Didier CONSTANTIN

Ingénieur E. N. S. C. S.

Contribution à l'étude des conformations de l'acide α - poly - L - glutamique

---

Soutenue le 14 novembre 1969 devant la Commission d'Examen

MM.	H. BENOIT	Président
	G. WEILL	Examinateur
	G. SPACH	»
	A. KEPES	Invité

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

N° d'ordre :

THESE

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir le grade de

Docteur ès-Sciences Physiques

par

Didier CONSTANTIN

Ingénieur E. N. S. C. S.

Contribution à l'étude des conformations de l'acide α - poly - L - glutamique

---

Soutenue le 14 novembre 1969 devant la Commission d'Examen

MM.	H. BENOIT	Président
	G. WEILL	Examinateur
	G. SPACH	»
	A. KEPES	Invité

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE STRASBOURG
FACULTE DES SCIENCES

Edition de :

Doyen : Professeur J.H. VIVIEN
Doyens Honoraires : A.KIRRMANN, P.LACROUTE, H.J.MARESQUELLE, G.MILLOT
Professeurs Honoraires : P.DE BEAUCHAMP, L.BOISSELET, H.CARTAN, G.CERF, C.CHABAUTY, A.CHRETIEN, J.DENY, Ch.EHRESMANN, M.FRECHET, Mle S.GILLET, A.HEE, R.HOCART, A.KIRRMANN, G.LEMEE, P.L'HERITIER, A.LICHNEROWICZ, L.NEEL, Ch.SADRON, E.TERROINE, H.VILLAT, H.WEISS, Et.WOLFF, J.YVON.

Maître de Conférences Honoraire : R.WEIL.

Professeurs :

H.J. MARESQUELLE	T.	Biologie végétale
H. FORESTIER	T.	Chimie générale
J. ROTHE	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE	T.	Astronomie
J.H. VIVIEN	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
A. MAILLARD	T.	Physicochimie du Pétrole
S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE	T.	Chimie Physique
R. LOMBARD	T.	Chimie organique
Mle M.PEREY	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY	T.	Biologie générale
H. BENOIT	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER	T.	Physique générale et physique corpusculaire
G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER	T.	Chimie minérale
Mle A.GAGNIEU	T.T.P.	Botanique
S. NIKITINE	T.	Physique générale
F. STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B. WURTZ	T.T.P.	Chimie biologique
J. BRENET	T.	Electrochimie
G. OURISSON	T.T.P.	Chimie
A. COCHE	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF	T.	Physique générale
J. FRENKEL	T.T.P.	Mathématiques
P. TAGLANG	T.	Physique
J.P. LONCHAMP	T.T.P.	Physique
A. DELUZARCHE	T.T.P.	Chimie
J.B. DONNET	T.T.P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER	T.T.P.	Physique
A. ROCHE	T.T.P.	Physique du Globe
L. HIRTH	T.	Microbiologie
A. SIGOT	P.S.C.	Zoologie
A. FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN	T.T.P.	Physique
P. MIALHE	T.T.P.	Physiologie animale
J.P. EBEL	T.	Chimie biologique
J. PARROD	T.T.P.	Chimie
R. WEY	T.T.P.	Chimie
Mme D. MAGNAC	T.T.P.	Physique
M. DAUNE	P.S.C.	Physique

J.P. ADLOFF	T.T.P.	Chimie nucléaire
D. BERNARD	T.T.P.	Méthodes mathématiques de la physique
E. DANIEL	T.	Physique expérimentale
P. CHEVALLIER	T.	Physique
J. GREMILLARD	T.T.P.	Mécanique des Fluides
P. CARTIER	T.	Mathématiques
G. REEB	T.	Topologie
R. CHAUVIN	T.	Psychophysiologie
J. WUCHER	P.S.C.	Physique
Mme BRINI M.	P.S.C.	Chimie
R. BARO	P.S.C.	Physique
H. DURANTON	P.S.C.	Botanique
R. WEISS	T.T.P.	Chimie
P. FEDERLIN	T.T.P.	Chimie
J. LERAY	P.S.C.	Physique
J.P. SCHWING	P.S.C.	Chimie
M. SIESKIND	P.S.C.	Physique
G. MONSONEGO	T.	Physique théorique
P. GABRIEL	T.T.P.	Mathématiques
C. WIPPLER	T.	Physicochimie des Hauts Polymères ind.
P.A. MEYER	T.T.P.	Mathématiques
G. WEILL	P.S.C.	Physique
J.M. BLOCH	T.	Chimie
A. CLAUSS	P.S.C.	Chimie
E. FOLLENIUS	P.S.C.	Zoologie
J. LUCAS	P.S.C.	Géologie
J.J. THIEBOLD	P.S.C.	Biologie animale
G. GLAESER	T.	Mathématiques
J.H. WEIL	P.S.C.	Chimie biologique
D. FOATA	P.S.C.	Mathématiques

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552713_0004

Professeurs associés :

A. BANDERET (E.A.H.P.) - R. CLELAND (Physique) - G. PEROLD (Chimie) - J.SAMPSON (Mathématiques) -

Maîtres de Conférences :

H. DANAN	Physique
Mme WINTER Chr.	Physique
J.P. EBERHART	Minéralogie
Mme D. CAGNIANT	Chimie
X. FERNIQUE	Mathématiques
J. STREITH	Chimie
F. GAUTIER	Physique propédeutique
G. SUTTER	Physique électronique
J.M. LEHN	Chimie
Cl. ROBERT	Physique
Fr. LACROUTE	Biologie végétale
A. GIRARDIE	Biologie animale
M. GOUNOT	Botanique
J. DEHAND	Chimie minérale
J. PRADINES	Mathématiques
F. BECKER	Physique mathématique
M. KAROUBI	Mathématiques
A. MIGNOT	Mathématiques appliquées
R. GERARD	Mathématiques
J. ROUX	Botanique
R. VOLTZ	Physique théorique
A. MICHARD	Géologie
J.M. GIRAUD	Mathématiques
Y. BOULANGER	Chimie biologique
D. DACUNHA-CASTELLE	Mathématiques
J.P. BRETAGNOLLE	Mathématiques
J.J. RIEHL	Chimie
Cl. DELACHERIE	Mathématiques

Maîtres de Conférences associés :

V. AVANISSIAN (Mathématiques) - J. APSIMON (Chimie) - R. CAIROLI (Mathématiques) - E. DADE (Mathématiques) - H. GOLDWHITE (Chimie) - G. LETTA (Mathématiques) - G. RINEHART (Mathématiques) - M. NIKOLIC (Physique corpusculaire) -

Secrétaire général de la Faculté : G. SAINT-PE.

A Mademoiselle Marie ROPTIN
Agrégée de l'Université

A Monsieur Gérard SPACH
Maître de Recherches au CNRS

A ma famille

A Monsieur le Professeur H. BENOIT

Ce travail a été effectué au Centre de Recherches sur les Macromolécules. J'ai été accueilli par Monsieur le Professeur Ch. SADRON, qui dirigeait alors ce laboratoire. Monsieur le Professeur BENOIT qui le dirigea par la suite m'a guidé tout au long de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur G. WEILL d'avoir bien voulu examiner ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur G. SPACH, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui a dirigé ce travail ; il m'a fait bénéficier de sa vaste expérience de la recherche et des polypeptides de synthèse.

La Société Ethylène-Plastique, qui m'a donné l'appui matériel pendant quatre années doit être remerciée en la personne de Monsieur KEPES, Directeur du Centre de Recherches de la Société ; je remercie ce dernier de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse.

Mes remerciements vont également à tous les membres du personnel du C.R.M. qui m'ont aidé de quelque façon que ce soit, et tout particulièrement à Madame POUYET pour toute la partie se rapportant à l'Ultracentrifugation ainsi qu'à Mademoiselle FEIGENBAUM pour son aide volontaire et efficace.

INTRODUCTION

Il est commode, lorsqu'on veut décrire une protéine, de distinguer quatre niveaux d'organisation :

- la structure primaire, qui n'est autre que la séquence, c'est à dire de la distribution des résidus d'acide aminé le long de la chaîne.

- la structure secondaire qui est la distribution géométrique dans l'espace des groupes d'atomes voisins sur la chaîne peptidique : par exemple, les formes hélicoïdales ou les formes étirées.

- la structure tertiaire qui rend compte du repliement global qui peut rapprocher des parties de la molécule très éloignées les unes des autres le long de la chaîne.

- la structure quaternaire d'une protéine liée à la possibilité pour une molécule de s'agglomérer avec d'autres chaînes pour former un ensemble plus complexe.

Les polypeptides de synthèse, comme les protéines, sont composés de résidus d'acides aminés et ils présentent l'intérêt de posséder des structures secondaires connues. Ils peuvent donc servir de modèles pour l'étude des protéines. Les facteurs influençant la stabilité des structures secondaires, formes hélicoïdales ou formes étirées, ont déjà été étudiés aussi bien en milieu organique qu'en solution aqueuse.

Cependant, on n'a guère étudié de structures tertiaire ou quaternaire bien définies dans les solutions de polypeptides de synthèse. Ce n'est que récemment que T.M. SCHUSTER[1] a montré que les molécules de l'acide α-poly-L-glutamique (note 1) peuvent coexister sous deux "états" en solution et que la transition de l'un à l'autre peut être induite par des variations de température ou de pH ; B.R. JENNINGS, G. SPACH et T.M. SCHUSTER[2] ont étudié ce phénomène par sédimentation, pouvoir optique

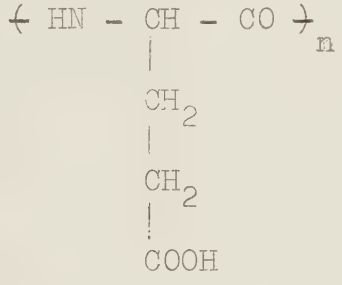
---

(note 1) : Il serait plus correct de dire et d'écrire poly (acide L-glutamique) d'où l'abréviation PALG

rotatoire, diffusion de lumière et viscosité, et ont conclu qu'il s'agissait d'un état structural organisé des molécules hélicoïdales. Par ailleurs, l'acide α-poly-L-glutamique présente une transition hélice pelote qui a été étudiée en fonction du pH et de la température[3, 11] ; ce polymère, dont la structure primaire est simple, est un modèle intéressant pour étudier les structures d'ordre supérieur. Nous allons rappeler les principaux résultats obtenus avec ce polymère.

Rappel des résultats antérieurs

La structure primaire du PALG est bien décrite à l'exception des résidus extrêmes à l'aide de la formule :



Pour la préparation de ce polymère, on est obligé de passer par l'intermédiaire d'un polyester, qui est le plus souvent le polyglutamate de benzyle et qui se prépare selon la méthode de polymérisation des anhydrides de Leuchs.

Quant à la structure secondaire, elle a été étudiée sous l'aspect de la transition entre deux formes : l'hélice et la chaîne statistique. En solution aqueuse saline, la transition a lieu entre pH 5 et 6 ; ce domaine de pH varie avec la force ionique. On suit principalement cette transition par des mesures

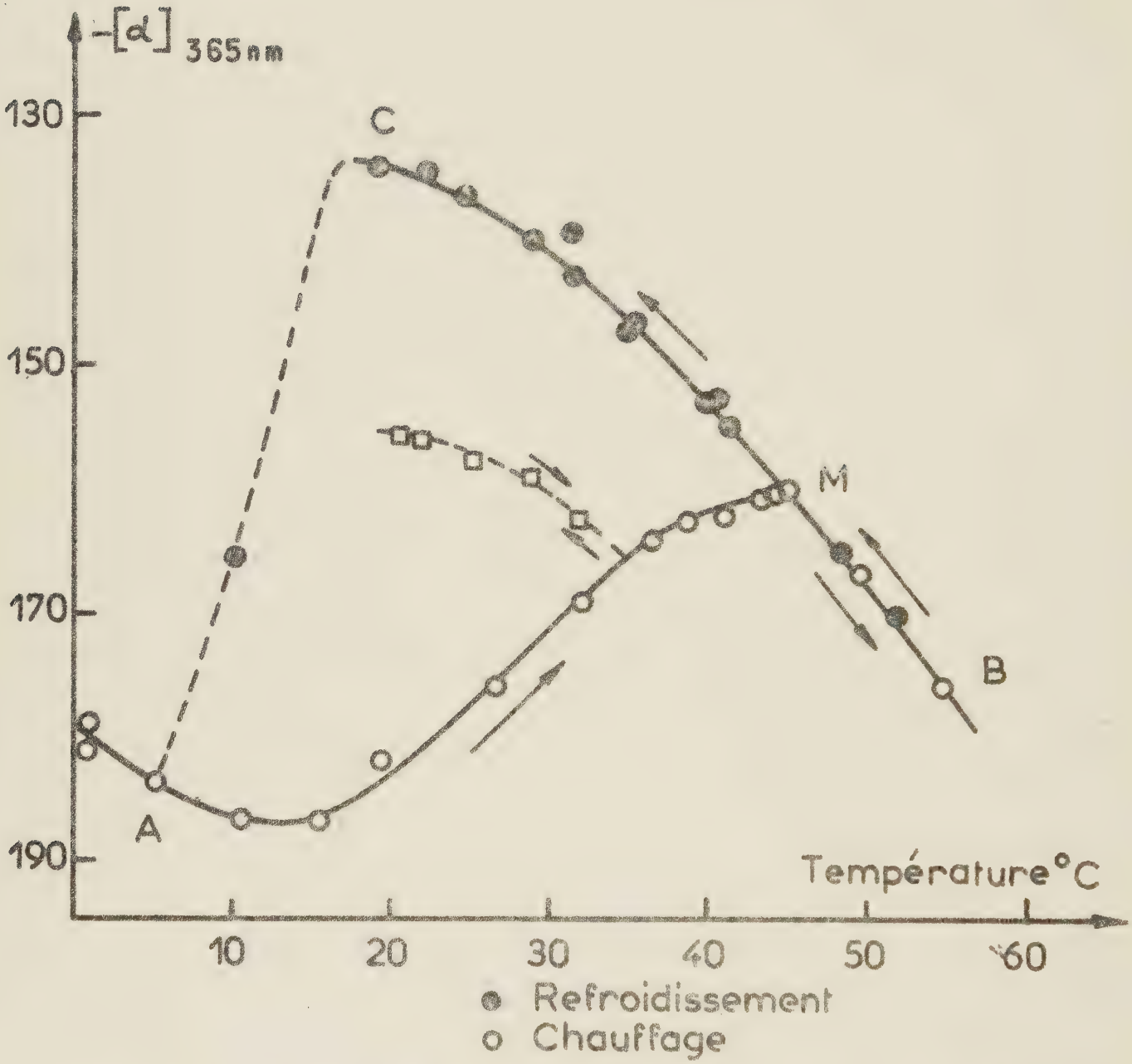


Fig. 1: Variation de la rotation spécifique du PALG avec la température
(Echantillon CRM 276, 025%, p_H 4,4
0,10 M CH_3COOH - KCl)

de pouvoir optique rotatoire ; des mesures de degré d'ionisation des chaînes latérales font apparaître des variations parallèles ; ce dernier phénomène est la principale cause de la transition d'après les différents auteurs.

Nous allons donner un peu plus de détails sur l'étude de la structure tertiaire, car c'est le problème qui nous intéresse.

Dans les solutions aqueuses diluées à pH inférieur à 4,5, l'acide α-poly-L-glutamique subit, en plus de la transition hélice-pelote, une nouvelle transition, distincte, mais non indépendante de la précédente.

Pour suivre ce phénomène, le plus simple est de considérer la variation de la rotation spécifique $[\alpha]$ avec la température (figure 1). Partons d'un point B situé vers 60°C ; la courbe BMC représente la transition pelote-hélice et est réversible tant que le point C n'est pas atteint. Quand on abaisse la température en-dessous de 20°C, on décrit la courbe CA qui représente l'agrégation des molécules hélicoïdales ; elle dépend beaucoup du temps et est irréversible. Le réchauffement conduit à la désagrégation selon un processus différent, ce qui donne lieu à une hystérésis ; la courbe AM est irréversible et ne dépend pas du temps. L'hystérésis a été observée à différents pH inférieurs à 4,5 à plusieurs forces ioniques, dans des mélanges de solvants aqueux et organiques, avec différents échantillons de PALG. La forme et la taille des cycles d'hystérésis représentant les variations de $[\alpha]$ en fonction de la température dépendent de la masse moléculaire de l'échantillon, du pH et du solvant. Les courbes de pénétration dans le cycle sont tout à fait analogues à celles que l'on trouve avec les autres systèmes d'hystérésis.

Le point M représente la température finale de désagrégation à laquelle la "fusion" des agrégats est complète. Cette température, indépendante de la masse moléculaire moyenne et de la concentration, dépend du pH et croît de façon monotone quand le pH décroît. Elle passe de 37 °C pour le pH 4,5 à 53°C pour le pH 4,1. L'analyse de la dispersion optique rotatoire selon l'équation de MOFFITT (voir première partie IV A) montre que le coefficient b_o subit une variation réversible par chauffage et par refroidissement. La conformation hélicoïdale du PALG apparaît donc comme n'étant pas affectée par l'agrégation. Par contre, le premier coefficient de l'équation de MOFFITT a_o subit comme $[\alpha]$ un cycle d'hystérésis.

Cette nouvelle transition a été étudiée par plusieurs autres techniques physiques. La viscosité spécifique qui décroît au cours de l'agrégation, est une première indication d'association latérale de molécules. Les mesures de diffusion de lumière tendent à montrer que l'association est spécifique par le fait qu'elle s'arrête lorsque 5 à 7 molécules se sont rassemblées pour former un agrégat dont le rayon de giration est peu différent de celui des molécules isolées au même pH.. SCHUSTER avait trouvé par la méthode d'ARCHIBALD un nombre moyen de 4 molécules par agrégat.

En résumé, au voisinage du point B, on a un mélange de structure hélicoïdale et de structure désordonnée ; en refroidissant la structure secondaire devient en majorité hélicoïdale, jusqu'à ce que, à la suite d'une sorte de germination, ces molécules hélicoïdales commencent à entrer dans un état d'organisation supérieure, caractérisé par un assemblage que les auteurs pensent être latéral. Ce phénomène a aussi lieu en fonction du pH.

C'est en partant de cet acquit que nous avons continué cette étude.

Présentation du travail

Le problème posé, une fois faite la description des phénomènes en solutions aqueuses, est la détermination de la structure des agrégats ; un autre problème est la spécificité de cette agrégation.

Deux phénomènes viennent perturber cette étude : la précipitation, terme désignant un processus qui conduit à une séparation visible de phases, et la formation de gel, qui est l'apparition d'une phase visqueuse d'aspect gélatineux. Sur la figure 2 nous avons représenté les domaines de manifestation des divers phénomènes en fonction du pH, ainsi que pour la transition hélice - chaîne dans un milieu de salinité 0,1 M.

Deux autres faits rendent difficile l'analyse quantitative de cette étude : la polydispersité des échantillons de PALG et le fait que le taux d'agrégation soit inférieur à 100 %. On verra un peu plus loin la technique que nous avons employée pour surmonter ces difficultés.

Dans la première partie de notre mémoire, pour décrivons les méthodes de préparation, de fractionnement et d'étude qui nous ont été nécessaire pour le travail.

Puis, dans une seconde partie, nous établissons la distinction qui existe entre les phénomènes de précipitation et d'agrégation.

Dans la troisième partie, nous étudions de plus près la précipitation au cours du temps, nous donnons aussi un aperçu de ce que peut être la structure du polymère précipité et ceci à l'aide de deux techniques : l'absorption infra-rouge et la diffraction des rayons X.

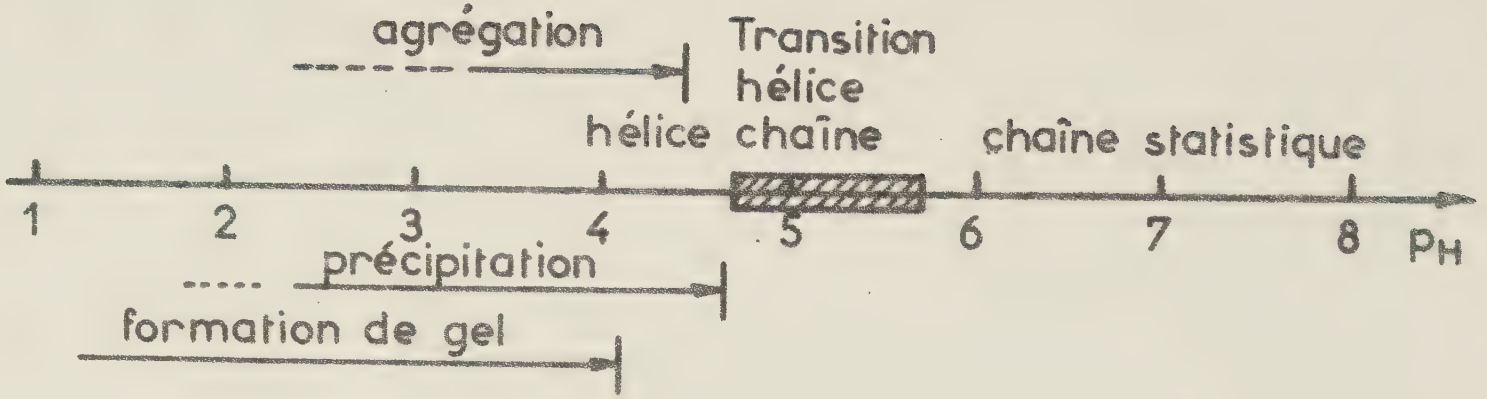


Fig. 2: Domaines de p_H de divers phénomènes interessant l'acide α-poly-L-glutamique (milieu de salinité 0,1 M)

Pour étudier les molécules agrégées, nous avons essayé de les séparer des molécules libres par chromatographie sur gel de dextrane, puis par précipitation spontanée des solutions au cours du temps. Nous avons étudié ces solutions ne contenant que des agrégats (quatrième partie) ; en particulier, des mesures de pouvoir optique rotatoire nous apportent des renseignements sur la métastabilité des molécules hélicoïdales en solution. Dans la cinquième partie, nous décrivons les méthodes employées pour déterminer le nombre moyen de molécules par agrégat et nous donnons une interprétation de nos résultats.

Première Partie

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Préparation et caractérisation des échantillons de PALG

Nous avons utilisé pour l'ensemble des phénomènes étudiés plusieurs échantillons de PALG ; un résumé de leurs principales caractéristiques est présenté dans le Tableau I.

La synthèse de ces polymères a été faite par la méthode de BLOUT et IDELSON[4] en utilisant le benzène comme solvant au cours de la débenzylation du polyglutamate de benzyle. Cette réaction a été effectuée à l'aide de l'acide bromhydrique, à la température ambiante. Le spectre ultra-violet (aux alentours de 257 nm) des échantillons en solution aqueuse montre pour la plupart des échantillons une débenzylation presque complète, c'est à dire au maximum 0,2 mole pour cent de résidu non débenzylé.

Afin de déterminer la masse molaire, une mesure de viscosité est faite sur chaque échantillon dans les conditions données par WADA[5], c. à d. en solution aqueuse 0,2 M NaCl à pH 7,3. La loi de type MARK-HOUWINK liant la masse molaire en poids et la viscosité intrinsèque a été établie à l'aide des résultats de WADA et de ceux de JENNINGS. Elle s'écrit :

$$[\eta]\ \mathrm{cm}^3.\mathrm{g}^{-1} = 313.10^{-5} \cdot M_w^{0,965}$$

Dans le tableau I, nous donnons deux masses molaires déterminées par diffusion de lumière dans des solutions de PALG dans le diméthylformamide (DMF), les autres n'ont été déterminées que par des mesures de viscosité. En effet, certains échantillons de PALG ne sont pas solubles dans le DMF, tandis que d'autres le sont ; pour l'instant, ce fait curieux reste inexpliqué ; il est sans doute lié à la structure de l'échantillon. Le domaine des masses obtenues se situe entre 10.000 et 100.000, avec une nette prédominance des échantillons de masse inférieure à 50.000 ; il serait intéressant de pouvoir disposer de polymère de masse

Tableau I

Echantillon	M_w	D.P.	mole % de benzyle restant	$[\eta]$ 0,2 M NaCl pH=7,3	Utilisations
CRM 140	14.000	108	$\ll$ 0,1	30	- Ultracentrifugation. - Etude précipitation.
CRM 163 rec.	84.000 (a)	651	$\ll$ 0,1	189	- précipitation.
CRM 211	29.000	225	$\ll$ 0,1	62,5	- Ultracentrifugation.
CRM 276	23.600 (a)	183	< 0,2	50	-fractionnement Sephadex. -Ultracentrifugation D.O.R.-
CRM 286	100.000	775		215	• R.X. -gels- -Ultracentrifugation D.O.R.- -fractionnement par précipitation
CRM 310	27.000	209	0,2	57,5	-fractionnement Sephadex. -Ultracentrifugation D.O.R.-
CRM 316	13.000	100	$\ll$ 0,1	27,5	-fractionnement Sephadex. -Etude précipitation
CRM 458	22.500	174	$\ll$ 0,1	49	Etude précipitation
CRM 460	37.000	287	$\ll$ 0,1	79	-Ultracentrifugation -Etude précipitation
CRM 477	25.000	194	0,77	52,5	-Ultracentrifugation -Etude précipitation
CRM 503	72.000	558	$\ll$ 0,1	155	-Ultracentrifugation - D.O.R. -
CRM 542	42.000	325		88	-Ultracentrifugation - D.O.R. -

(a) M_w de la forme acide déterminé par diffusion de lumière à l'aide de solutions dans le DMF et à une concentration dans le tampon aqueux; les autres masses moléculaires ont été calculées à partir des résultats de viscosités à l'aide de la relation de type MARK-HOUWINK .

moyenne plus grande, en particulier pour les mesures de diffusion de lumière. C'est pourquoi nous décrivons maintenant, bien que nous n'ayons pas de résultats positifs, des essais d'obtention de polymère de forte masse moléculaire.

II. Essais d'obtention du PALG de forte masse molaire et faible polydispersité

Lors de la débenzylation du poly-L-glutamate de benzyle par le gaz bromhydrique anhydre, des coupures de la chaîne principale du polymère se produisent, et par conséquent ceci explique pourquoi on ne trouve pas d'échantillons de PALG de masse supérieure à 100.000. De plus il y a vraisemblablement accroissement de la polydispersité quand on passe du polyglutamate de benzyle

$$(\frac{M_w}{M_n} = 1,3)$$

(12, 13, 29) au polyacide

$$(\frac{M_w}{M_n} > 2) \qquad (14)$$

s'il y avait coupure au hasard, M_w/M_n devrait tendre vers 2 ; or d'après des résultats non publiés de WADA et DOTY cités dans la référence 14, la polydispersité aurait une valeur supérieure à 2.

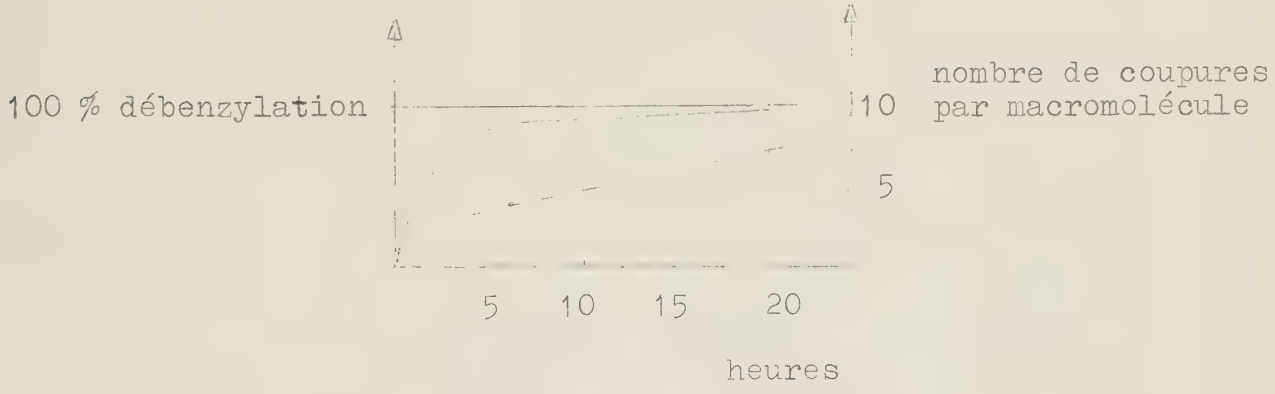
Nous avons alors essayé différents moyens pour empêcher ces coupures de se produire ou pour en limiter l'importance soit en modifiant les conditions de débenzylation, soit en employant un autre ester. Enfin, nous avons essayé de fractionner le polymère obtenu pour en extraire une gamme de masses moléculaires peu polydisperses.

A. Changement des conditions de débenzylation[15]

L'action de trois facteurs a été étudiée :

1) La durée de traitement au gaz bromhydrique
2) La température
3) La lumière

1) A température ambiante au bout de six heures, la débenzylation est presque complète ; si l'on prolonge la débenzylation sera totale mais le degré de polymérisation aura beaucoup diminué.



2) La débenzylation est beaucoup plus rapide à température ordinaire qu'à froid, mais les coupures de chaîne sont aussi beaucoup plus nombreuses[16]. Par exemple on atteint le même taux de débenzylation après 72 heures à 4°C ou après 5 heures à température ambiante.

3) On a observé que la lumière tout en n'intervenant pas dans la débenzylation, semblait favoriser les coupures de chaînes ; on a donc intérêt à opérer en flacon brun.

B. Choix d'un autre ester de l'acide glutamique

Il s'agissait de trouver un groupement ester hydrolysable dans des conditions opératoires plus douces que celles employées pour le groupement benzyle. Trois de ces groupements ont été envisagés : les groupes p - méthoxybenzyle, t - butyle et p - nitrophényle.

Abréviations utilisées :

HCluOH :	acide glutamique
Z	groupe benzyloxycarbonyle
HGluOBz :	α - glutamate de benzyle
HGlu(OBz)OH :	γ - glutamate de benzyle
HGlu(ONP)OH :	γ - glutamate de p - nitrophényle
DCCI :	dicyclohexylcarbodiimide

1) Préparation du γ-glutamate de p-méthoxybenzyle

Les deux méthodes utilisées, celle de STEWART[17] et celle de HANBY[18] donnent des rendements trop faibles pour être intéressantes.

2) Préparation du γ-glutamate de t - butyle

a) Méthode directe

C'est la méthode de TASCHNER et collaborateurs[19]. On fait réagir à froid sur l'acide glutamique l'acétate de t - butyle en présence d'acide perchlorique. Ensuite il faut éliminer l'acide glutamique n'ayant pas réagi du mélange contenant l'ester en α , l'ester en γ et le diester. La méthode donne un moyen pour séparer les esters de l'acide, mais aucun pour avoir le γ - ester pur.

Ensuite, nous avons essayé des méthodes dans lesquelles on passe par des composés intermédiaires ayant des fonctions α -amine et α -carboxyle protégées.

b) Méthodes indirectes

Dans toutes ces méthodes on protège la fonction α -carboxyle, même si on ne protège pas la fonction amine ; ensuite on fixe le groupement désiré en γ ; il reste à libérer la fonction α acide carboxylique et, le cas échéant, la fonction amine.

b^1) La fonction amine est protégée en premier lieu

$$HGluOH + ZCl \longrightarrow ZGluOH + HCl \qquad \text{(réf. 20)}$$

(chloroformiate de benzyle)

$$ZGluOH + \text{Anhydrique Acétique} \longrightarrow Z\ PyroGlu \qquad \text{(réf. 21)}$$

(anhydride de ZGluOH)

$$Z\ PyroGlu + C_7H_7OH \text{ (alcool benzylique)} \longrightarrow \left\{ \begin{array}{l} ZGluOBz \\ \text{et} \\ ZGlu(OBz)OH \end{array} \right. \qquad \text{(réf. 22)}$$

NEFKENS et NIVARD[23] ont trouvé un moyen de séparer les deux produits : le sel de dicychlohexylamine se forme d'abord avec la fonction acide en γ et les auteurs ont pris soin d'opérer dans un solvant des esters qui sont un précipitant pour les sels de dicyclohexylamine. Malgré les avantages de cette méthode, il faut signaler la difficulté de cristallisation des sels (qui ont des points de fusion bas) et l'impossibilité dans laquelle nous nous sommes trouvés de les recristalliser.

b^2) La fonction carboxyle est protégée en premier lieu

$$HGluOH + C_7H_7OH \xrightarrow{HCl\ gazeux} HCl, HGlu(OBz)OBz \quad (Réf.\ 24)$$

$$HCl, HGlu(OB_z)OB_z \xrightarrow[HI]{CH_3COOH} HGluOBz + HGlu(OBz)OH$$

A partir du α glutamate de benzyle, on peut soit passer directement au diester mixte, soit protéger la fonction amine.

- Passage au diester mixte

$$HGluOBz + \text{isobutylène} \xrightarrow{H_2SO_4} HGlu(OtBut)OBz \quad (Réf.\ 25)$$

ou

$$HGluOBz + \text{Ac. de } \underline{t} \text{ butyle} \xrightarrow{HClO_4} HGlu(OtBut)OBz \quad (Réf.\ 26)$$

- Protection de la fonction amine

$$HGluOBz + ZCl \longrightarrow ZGluOBz \quad (Réf.\ 20)$$

$$ZGluOBz + \text{isobutylène} \xrightarrow{H_2SO_4} ZGlu(OBut)OBz \quad (Réf.\ 25)$$

Toutes ces méthodes indirectes ont deux défauts fondamentaux :

- il y a de nombreuses étapes, donc les rendements finaux sont faibles
- il y a toujours le problème de la purification des produits

3) Essai de préparation du χ-glutamate de p-nitrophényle

ZGluOBz (dans le diacétate d'éthyle) + p-nitrophénol (Réf. 27)

DCCI

ZGlu(ONP)OBz

ZGlu(ONP)OBz —(HBr, CH_3COOH)→ HBr, HGlu(ONP)OH

F = 182 - 183°C

Ce dernier corps, non cité dans la littérature, est soluble dans le dioxanne et le tétrahydrofuranne, et est insoluble dans l'acétate d'éthyle. Pour préparer le N-Carboxy-anhydride, nous l'avons mis en suspension dans l'acétate d'éthyle et fait passer un courant de phosgène. Il y a dissolution de la suspension après chauffage à 60°C pendant le passage du gaz. Après distillation de l'acétate d'éthyle, on obtient un résidu dont on a essayé la solubilité dans divers solvants de polymérisation sans succès.

4) Conclusion

Ces préparations se révèlent longues et laborieuses ; d'autres chercheurs ont continué dans cette voie et, en particulier ont obtenu du polyglutamate de triméthyl-benzyle ; malheureusement ce polyester a une faible masse moléculaire. Le problème n'est donc pas résolu ; il faudrait trouver d'autres esters qui soient labiles dans des conditions différentes.

c) Essais de fractionnement

Signalons d'abord le travail de SNIPP[28] qui a fractionné quantitativement du PALG dans des colonnes de DEAE-cellulose avec un gradient de NaCl ; signalons aussi un essai négatif[29] sur gel de polystyrène (GPC Waters).

Des essais de fractionnement par solubilité ont été tentés en vue de diminuer la polydispersité ; sur un échantillon en solution dans le DMF on a essayé successivement comme précipitants le méthanol et l'acétone qui n'ont pas un grand pouvoir précipitant dans ce cas, puis le tétrachlorure de carbone qui donne un précipité franc ; avec ce dernier, on a recueilli plusieures fractions et mesuré leurs masses par viscosité, il est apparu qu'il n'y avait pas eu fractionnement. Nous avons repris l'étude du fractionnement par chromatographie sur gel perméable de dextrane, il en sera question plus loin. Nous verrons aussi que la précipitation du polymère dans des solutions aqueuses conduit à un fractionnement.

III. Préparation des solutions

Nous avons surtout utilisé des solutions tamponnées.

a) Solutions tamponnées

Les solutions des échantillons utilisés sont préparées en dissolvant à température ambiante une quantité déterminée de PALG dans NaOH 0,16 N. Quand la dissolution est achevée, on ajoute une solution de KCl 0,24 M et on ajuste le pH avec de l'acide acétique 0,8 M. On ajoute ensuite de l'eau jusqu'à ce que la solution finale soit 0,10 M en acétate de sodium-chlorure de potassium ; ceci n'est obtenu directement que pour les

concentrations en polymère inférieures ou égales à 0,5 %. Pour les concentrations supérieures à 0,5 %, la dissolution exige une plus grande quantité de soude, ce qui entraîne une molarité globale supérieure ; pour revenir à la molarité 0,10, nous dialysons ces solutions une fois préparées contre un grand volume de tampon du même pH et de molarité 0,10 en CH_3COONa-KCl. Pour les expériences de chromatographie sur gel et certaines expériences d'ultracentrifugation, les solutions utilisées sont systématiquement dialysées quelle que soit leur concentration. Nous avons utilisés pour mesurer les pH, d'abord un pH mètre Radiometer PHM 25 SE, ensuite un autre de la même marque, mais de type TTT lc avec une expansion d'échelle type PHA 630 Ta ; ils sont équipés d'une électrode de verre et nous étalonnons les appareils à l'aide de solutions tampons standard pH 4,00 et pH 5,00 (Merck) à la température ambiante.

Les solutions sont filtrées soit avec un filtre Millipore 0,45 micron, soit avec un verre frité n° 4. On ajoute aux solutions une goutte de chloroforme après préparation ou bien 0,02 % d'azoture de sodium pendant leur préparation, afin de prévenir le développement de bactéries.

La concentration de nos solutions a toujours été calculée à partir de la quantité pesée de PALG. Il est connu que le Poly-L-glutamate de sodium contient une mole d'eau par mole de résidu[30] ; par contre, on n'a pas trouvé d'eau absorbée par les échantillons de PALG fraîchement préparés[4]. Les résultats d'analyses élémentaires que nous avons effectuées sur plusieurs échantillons conservés depuis un certain temps montrent que la forme acide fixe comme le sel de sodium une mole d'eau par résidu.

b) Solutions non tamponnées

Pour ajuster le pH, on remplace l'acide acétique 0,8 N par de l'acide chlorhydrique 0,1 N ; le reste des opérations est inchangé.

IV. Techniques expérimentales

A. Pouvoir optique rotatoire et dispersion

Les mesures de pouvoir optique rotatoire ont été effectuées au début avec un polarimètre photoélectrique Stanley équipé d'un monochromateur à prisme en quartz, la source lumineuse étant une lampe au xénon haute pression Osram 150 W. On a utilisé une cellule polarimétrique thermostatée de longueur 1,0 décimètre. Le domaine de longueurs d'onde d'utilisation de cet appareil s'étend de 365 à 579 nm. Par la suite nous avons eu à notre disposition un spectropolarimètre enregistreur Spectropol I (Sofica), dont le domaine de longueurs d'onde s'étend de 600 à 200 nm ; les cuves ont pour épaisseur soit 1 mm soit 1 cm. Les résultats des mesures ont été analysés à l'aide de l'équation de MOFFITT-YANG[31] en prenant λ_o = 212 nm et 129 pour la masse molaire d'un résidu. (Nous n'avons pas fait de correction de température pour indice de réfraction du solvant aqueux). La rotation spécifique par résidu corrigée par l'indice de réfraction est :

$$[m'] = \frac{3}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{100} \cdot [\alpha]$$

et l'équation de MOFFITT-YANG s'écrit :

$$[m'_\lambda] = \frac{a_o \lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2} + \frac{b_o \lambda_o^4}{(\lambda^2 - \lambda_o^2)^2}$$

En portant $[m'_\lambda] \cdot (\lambda^2 - \lambda_o^2)$ en fonction de $(\lambda^2 - \lambda_o^2)^{-1}$

on obtient dans le cas du PALG une droite ; a_o est fournie par la valeur de l'ordonnée à l'origine et b_o par celle de la pente.

B. Chromatographie sur gel

Les premières expériences de chromatographie ont été faites sur des colonnes de Sephadex G 100 à température ambiante ; ensuite nous avons essayé le Sephadex G 200 et le Bio-Gel P 300 et nous avons opté pour le G 200 (voir 4e partie, paragraphe II C). Ces derniers fractionnements ont été effectués à température constante grâce à une colonne thermostatée en verre Pyrex fabriquée au CRM. Les embouts de colonne ont été fabriqués au CRM d'après un schéma de SPACH et BRACK (voir figure 3).

Pour rendre comparables les différentes expériences de chromatographie, nous avons maintenu constant le volume des fractions recueillies : 2,7 cm^3 ; ces fractions collectées automatiquement ont ensuite été analysées par spectrographie ultraviolette sur un appareil Zeiss PMQ II à 220 nm dans des cuves en quartz de 0,5 ou 1 cm d'épaisseur. La mesure de la densité optique à cette longueur d'onde permet de tracer les diagrammes de la concentration en fonction du volume d'élution.

Légende de la figure 3

1. Tube en Pyrex
2. Joints d'étanchéité en "Parafilm M"
3. Toile de nylon fin
4. Grille de nylon
5. Pièce en téflon
6. Joints toriques

7 à 12. Ensemble de fixation

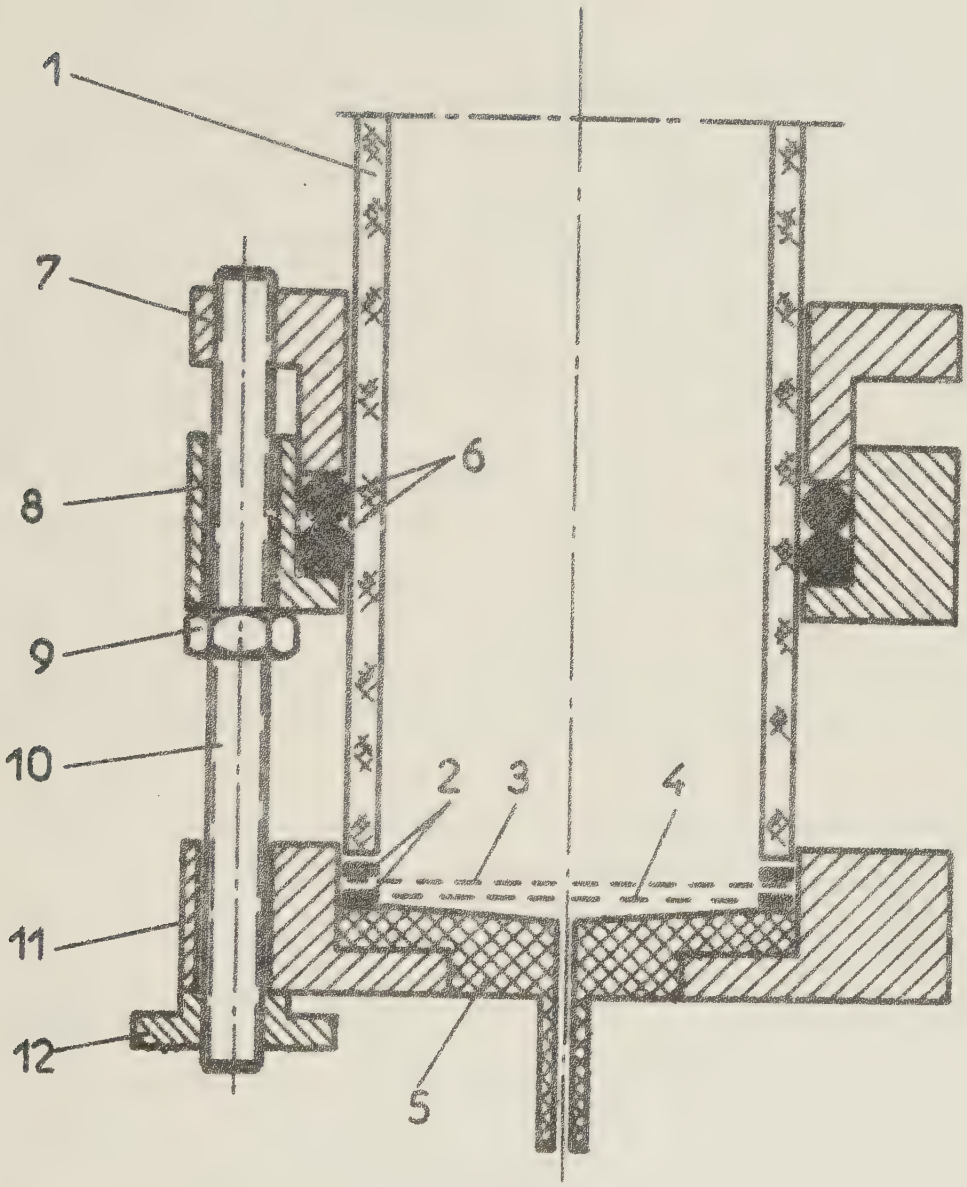


Fig. 3: Schéma d'un embout de colonne de chromatographie sur gel

C. Ultracentrifugation

Les expériences de sédimentation et d'équilibre de sédimentation ont été faites avec une ultracentrifugeuse Spinco analytique modèle E. Le contrôle de température se fait à ± 0,5°C. Pour déterminer les constantes de sédimentation, la vitesse est soit 42.040, soit 50.760 tours/min. Quelle que soit la température à laquelle on opère, les valeurs des constantes de sédimentation sont ramenées à leur valeur à 20°C. Les valeurs de l'incrément d'indice de réfraction utilisées dans les calculs de ces constantes sont celles mesurées par JENNINGS[2] ; de plus comme les solutions sont dialysées (si celles ont précipité) avant toute manipulation d'ultracentrifugation contre un tampon ayant le pH initial et la molarité 0,1 M CH_3COOH-KCl, les valeurs des constantes de sédimentation trouvées doivent être multipliées par la viscosité relative du tampon correspondant :

pH	4,4	4,4(+ 0,02 % NaN_3)	4,3	4,2	4,1
viscosité relative	1,011	1,025	1,015	1,018	1,023
molarité en CH_3COOH	0,060	0,065	0,075	0,099	0,127

La vitesse de rotation pour les équilibres dépend de l'ordre de grandeur de la masse recherchée. Les cellules utilisées ont, soit 12, soit 30 mm d'épaisseur. Des cellules à frontière préformée et à capillaire ont été utilisées pour déterminer les concentrations. Les aires des clichés obtenus

en optique réfractométrique sont mesurées après agrandissement soit par intégration soit par pesée.

D. Rayons X

Nous avons réalisé les diagrammes de diffraction de poudre à l'aide d'une chambre DEBYE-SCHERRER, le rayonnement X de longueur d'onde 1,54 Å étant produit par un générateur Philips 1010 (à anticathode de cuivre) ; la relation de Bragg ($\lambda = 2\ d \sin \theta$) permet de déterminer les distances réticulaires des substances analysées.

E. Spectroscopie Infra-Rouge

Les spectres d'absorption Infra-Rouge ont été enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer modèle 237 pour le domaine 4000-625 cm^{-1} et sur Perkin Elmer modèle 125 pour le domaine 800-600 cm^{-1}.

Les essais avec les solutions deutérées ont été effectués dans des cellules démontables munies de fenêtres en Irtran et d'épaisseur 0,25 mm environ.

Deuxième Partie

DISTINCTION ENTRE LES PHENOMENES D'AGREGATION ET DE PRECIPITATION. ANALYSE CHROMATROGRAPHIQUE.

Introduction

Nous avons insisté dans l'introduction générale sur les phénomènes qui pouvaient se dérouler simultanément dans les solutions aqueuses de PALG aux faibles pH et sur le problème de leur relation.

Les auteurs des travaux antérieurs ont signalé que les solutions de PALG à faible pH, étaient instables et qu'un précipité thermiquement irréversible se formait spontanément. On a d'abord parlé indifféremment de précipitation et d'agrégation sans distinguer les deux phénomènes. Pourtant, alors que pendant l'agrégation les solutions restent limpides, pendant la précipitation, l'apparition d'un trouble se manifeste au début, et après plusieurs jours, d'un précipité compact se rassemble au fond du récipient laissé au repos. Avant même que l'observateur ne l'aperçoive, la précipitation provoque une diminution du pouvoir optique rotatoire et une augmentation considérable de l'intensité de la lumière diffusée par les solutions. Des observations qualitatives montrent que ce phénomène est d'autant plus rapide que le pH est plus faible (entre pH 3,8 et pH 4,4) et que la masse moléculaire du PALG diminue. La précipitation se manifeste surtout dans la partie BMC du cycle d'hystérésis, c'est à dire à température élevée et quand les molécules ne sont pas agrégées (Fig. 1, Introduction).

Nous avons entrepris une étude détaillée de ces phénomènes au moyen de la technique de fractionnement sur gel perméable de dextrane (Sephadex). Nos résultats ont établi la différence qui existe entre les deux phénomènes et ont permis de préciser, en particulier, le rôle de la masse moléculaire.

I. Précisions expérimentales

L'échantillon CRM 276 (tableau I, Première partie) a été utilisé en solution aqueuse - 0,10 M acétate de sodium + KCL à pH 4,4 à la concentration de 0,25 g dans 100 cm^3.

Des prélèvements de 2,0 cm^3 ont été employés pour alimenter une colonne de Sephadex G 100, de 90 cm de hauteur et de 2 cm de diamètre, préalablement équilibrée avec le solvant. Le pouvoir de résolution de ce type de gel, bien qu'il ne permette pas de couvrir entièrement le spectre des masses moléculaires de l'échantillon, s'est révélé suffisant pour l'étude que nous avons entreprise dans cette partie.

L'analyse des fractions recueillies a été effectué comme indiqué dans la première partie. Sur les figures qui suivent les valeurs de la densité optique des fractions sont représentées par une ligne continue qui est la moyenne des résultats. Pour faciliter la comparaison des courbes, les lignes de base ont été ramenées à une même valeur. Les aires délimitées par ces courbes sont directement proportionnelles au pourcentage du type de molécules qu'elles représentent si l'on admet que le coefficient d'extinction ε est identique pour les molécules libres et les molécules agrégées.

Les fractionnements ont été effectués à température ordinaire (environ 25°C). Selon le traitement thermique préalablement subi par les solutions, les macromolécules présentes sont par conséquent soit dispersées, soit partiellement agrégées.

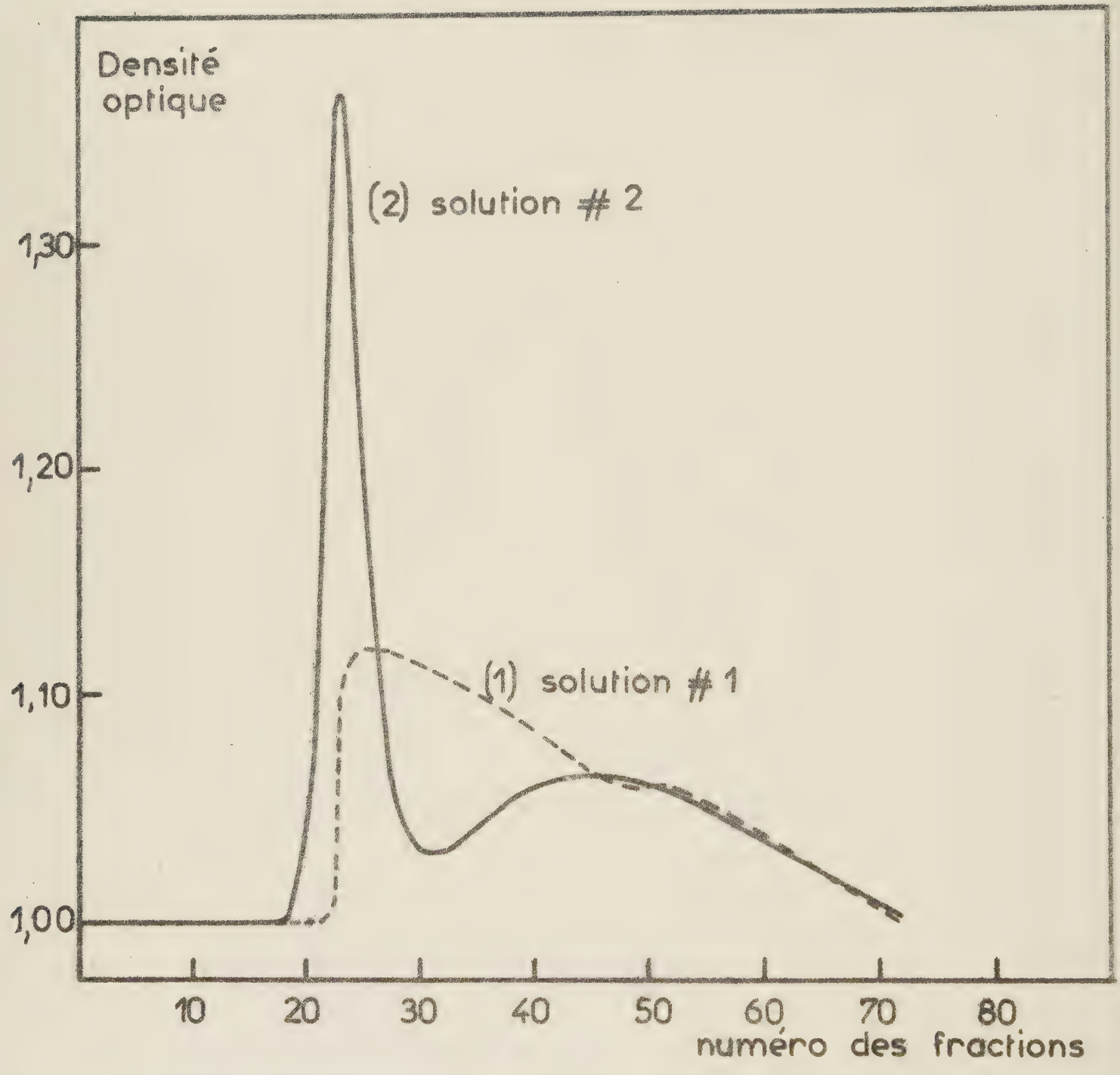


Fig. 4 - Densités optiques des différentes fractions obtenues avec les solutions # 1 et # 2 sur Sephadex G 100 (Echantillon CRM 278, 0,25 %, pH 4,4)

II. Résultats

Le tableau II résume les traitements effectués.

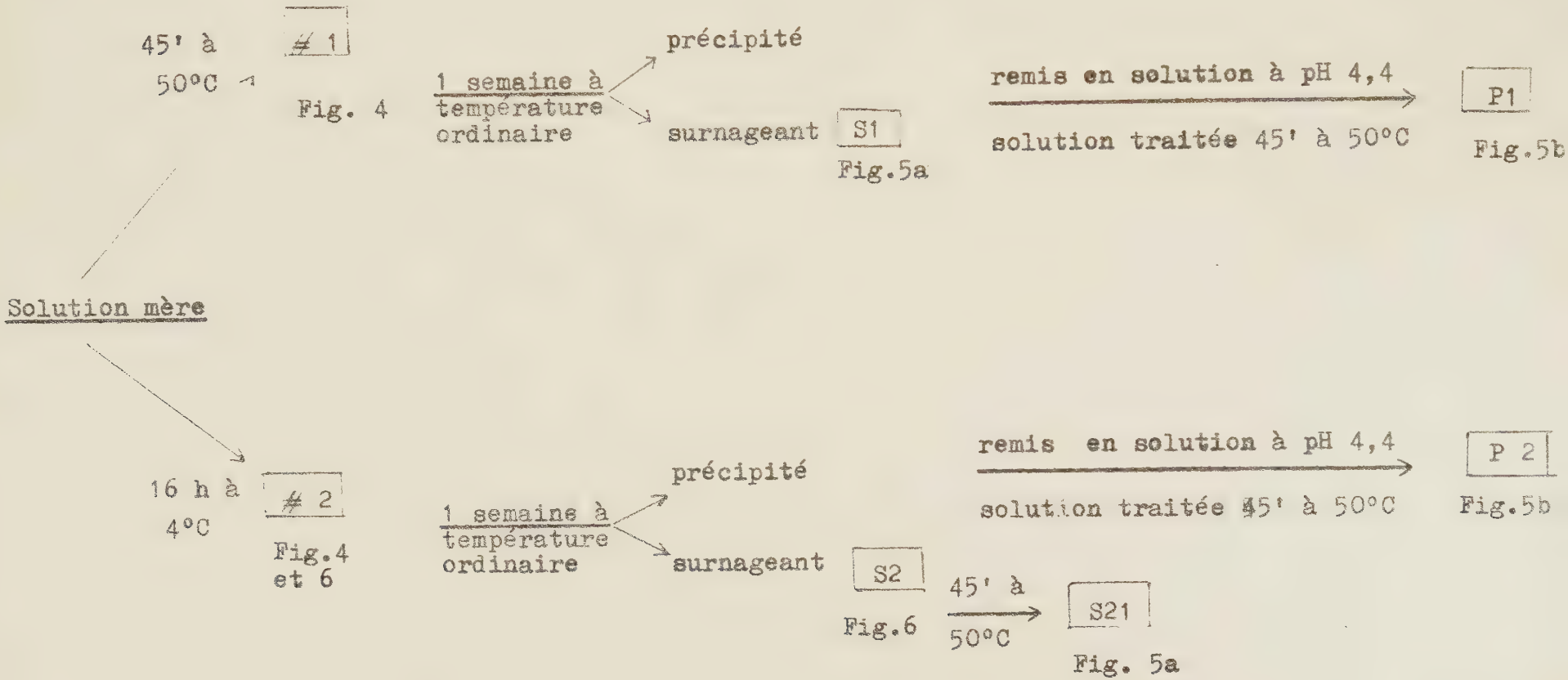
A. Etude de l'agrégation

Sur la figure 4 la courbe (1) correspond à une solution portée d'abord à 50°C pendant 45 minutes, de façon à provoquer la désagrégation complète des molécules, puis ramenée à température ordinaire (solution # 1). On constate que les molécules des masses les plus élevées, qui s'éluent les premières de la colonne, ne sont pas fractionnees par suite de la limite du pouvoir séparateur du gel de dextrane dans ce domaine de masses. La courbe de fractionnement est large, mais, faute d'un étalonnage du volume d'élution en fonction de la masse moléculaire nous ne pouvons pas en déduire des conclusions sur la polydispersité. La courbe (2) correspond à la même solution initiale portée à 4°C pendant une nuit et fractionnée à température ordinaire (solution # 2). On constate la présence d'un pic important dû aux molécules agrégées qui se sont formées pendant le traitement thermique. Ce pic sort, comme on pouvait s'y attendre avec le front de la colonne et il est suivi d'un deuxième pic nettement séparé. Ceci confirme les résultats de l'ultracentrifugation (2) qui ont montré la coexistence, dans les solutions soumises à basse température, de deux composantes, l'une due aux molécules agrégées, l'autre aux molécules restées isolées.

La comparaison des deux courbes apporte un renseignement supplémentaire important : dans un échantillon les molécules de plus fortes masses se trouvent présentes dans la fraction des agrégats; en effet les deux courbes sont confondues vers les faibles masses.

TABLEAU II

Etude de l'agrégation



Les aires délimitées par les courbes (1) ou (2) et la ligne de base, mesurées au planimètre, sont égales à 10 % près. On peut se fier à la mesure des aires pour avoir un ordre de grandeur des concentrations, vu la reproductibilité des courbes chromatographiques. La surface du pic des molécules agrégées de la courbe (2) représente 50 % de l'aire totale. Etant donné le pH auquel nous avons travaillé, cette proportion correspond sensiblement au résultat trouvé par sédimentation et par un autre expérimentateur (46 %). La dilution importante produite au cours du fractionnement sur la colonne ne semble donc pas avoir affecté le taux d'agrégation. Ceci confirme les conclusions formulées par JENNINGS, SCHUSTER et SPACH[2] qui ont vérifié par étude du pouvoir optique rotatoire que la stabilité des agrégats n'est pas affectée lors de la dilution.

L'analyse d'une solution de concentration initiale de 1 % en PALG traitée dans les mêmes conditions indique environ 60 % de molécules agrégées.

B. Etude de la précipitation

Les solutions # 1 et # 2 (tableau II) ont été abandonnées à température ordinaire pendant une semaine. Les précipités (P_1 et P_2) qui se sont formés et les surnageants (S_1 et S_2) correspondants ont été analysés séparément. Nous avons fait 2 parts de S_2 : l'une (S_{21}) a été portée, avant analyse, à 50°C pendant 45 minutes pour désagrégation. Les précipités P_1 et P_2 ont été séchés sous vide et pesés ; ils ont été redissous dans une solution alcaline qui est ensuite ramenée aux conditions habituelles et traitée à 45°C avant analyse chromatographique.

Nous constatons que la précipitation est plus abondante dans la solution # 1 ; elle fournit environ 25 % de précipité contre 18 % dans la solution # 2. On retrouve des

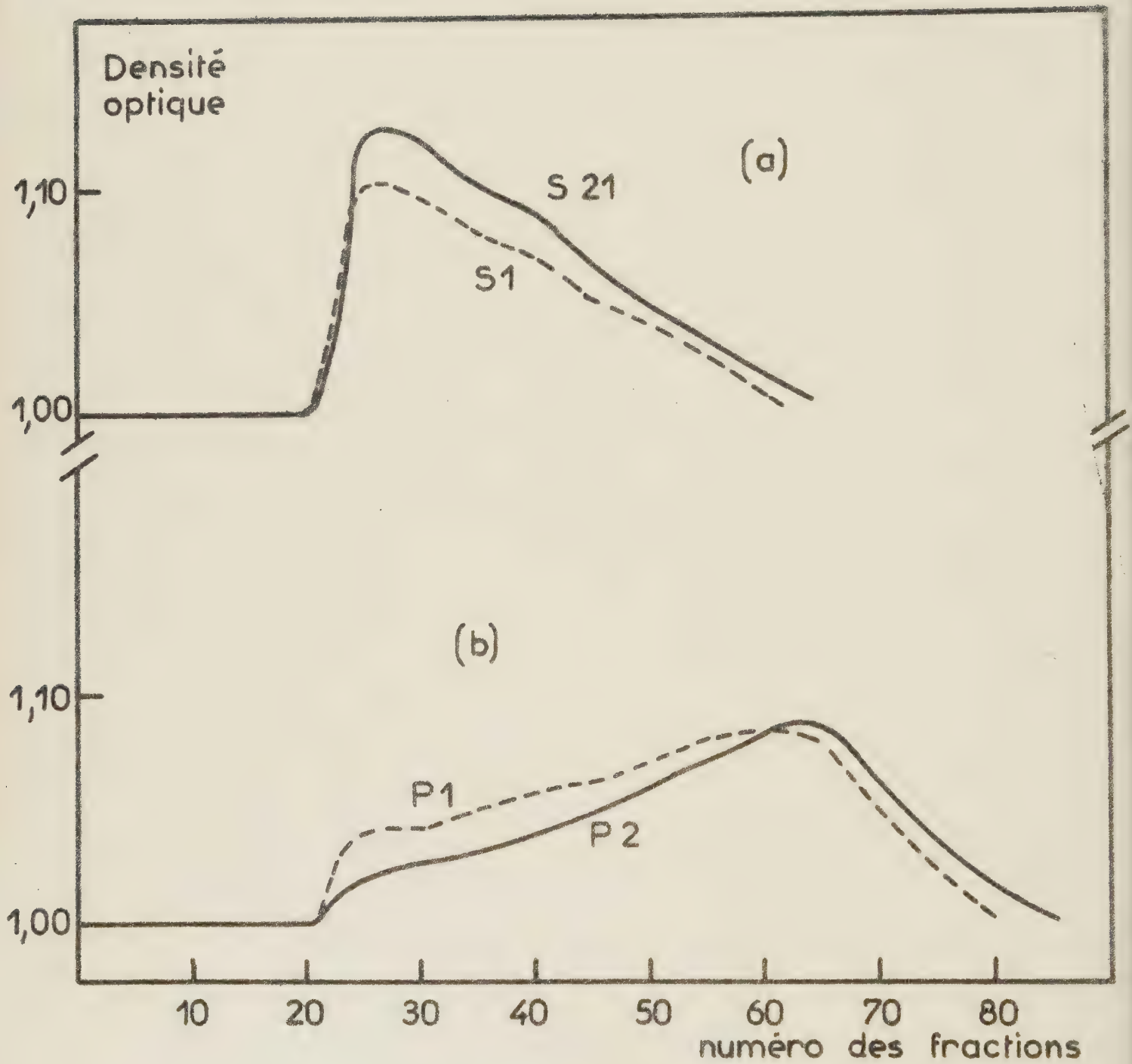


Fig. 5 - (a) Courbes de fractionnement des surnageants (--) S_1 et (-) S_{21}

(b) Courbes de fractionnement des précipités (--)P_1 et (-) P_2

valeurs voisines, respectivement 27,4 % et 16,5 %, en retranchant des aires délimitées par les courbes (1) et (2) de la figure 4 celles des courbes de fractionnement obtenues pour les solutions S_1 et S_{21} (figure 5a). On remarque en outre que dans la fraction S_{21} la quantité de PALG restée en solution est plus importante et contient une plus forte proportion que S_1 de molécules de fortes masses moléculaires ; elles étaient sous forme d'agrégats dans S_2.

Par ailleurs, nous avons préparé deux solutions de même pH et de même concentration mais ayant subi l'une un chauffage à 50°C et l'autre un refroidissement à 4°C. Les photographies prises 4 jours après la préparation montrent que la solution traitée à chaud précipite plus vite que la solution conservée à froid. Ceci confirme nos conclusions précédentes.

Sur la figure 6, nous avons comparé la courbe de fractionnement relative à S_2 à celle de la solution # 2. On constate que seules les molécules non agrégées ont été éliminées de la solution # 2 au cours de la précipitation. Ce résultat est important car il montre clairement que l'agrégation n'est pas une étape intermédiaire du phénomène de précipitation.

Les surnageants S_1 et S_2 ont été abandonnés à température ordinaire pendant deux mois. D'après les courbes de fractionnement, la quantité de précipité formé est, au total, de 78 % pour la solution # 1 et de 36 % pour la solution # 2. L'aire du pic correspondant aux molécules agrégées dans cette dernière solution est encore égale, à 7% près, à celle mesurée sur la figure 4. Il reste cependant des molécules libres (figure 6) et, à ce stade de l'étude, il nous est apparu inutile de chercher, à obtenir des solutions ne contenant que des molécules agrégées en laissant simplement les molécules isolées s'éliminer par précipitation.

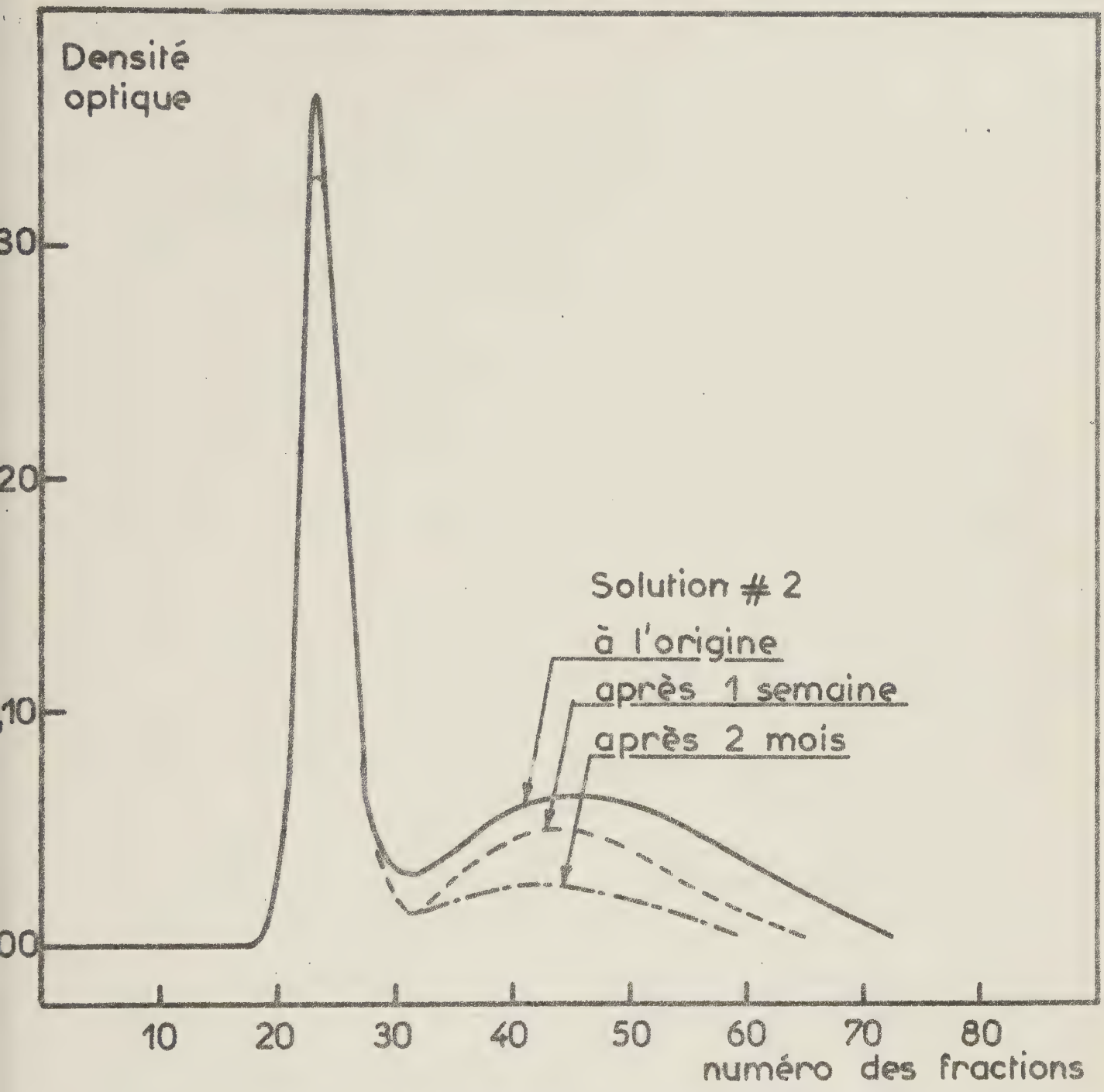


Fig. 6 : Courbes de fractionnement de la solution # 2 (—) à l'origine ; (- - -) après 1 semaine (surnageant S_2) (— · —) après 2 mois

Ce point de vue s'est modifié par la suite, lorsque nous avons travaillé sur des solutions dix fois plus concentrées, qui précipitent donc plus vite et pour lesquelles nous nous sommes aperçus qu'au bout de trois mois, nous obtenions des solutions où il reste seulement des agrégats.

L'analyse des précipités P_1 et P_2 (figure 5b) montre qu'ils contiennent d'avantage de molécules de faibles masses que la solution initiale. En effet le maximum des courbes de fractionnement est nettement déplacé vers les grands volumes d'élution. Ceci confirme encore la différence qui existe entre l'agrégation et la précipitation.

Conclusions

Ce premier essai de chromatographie sur gel perméable nous a encouragé dans son utilisation pour les études qualitatives, ainsi que pour les études quantitatives, puisque les aires totales mesurées donnent des resultats comparables. Ceci nous a amené par la suite à étalonner ces colonnes, c'est à dire relier le volume d'élution à la masse moléculaire.

Ces premières analyses chromatographiques nous ont permis de confirmer l'existence du phénomène d'agrégation : il se manifeste par l'apparition d'un nouveau pic dans les courbes de fractionnement des solutions préalablement traitées à basse température. Elles ont montré aussi la présence dans ces solutions de deux fractions de masses moléculaires moyennes très différentes, dont nous faisons la séparation de manière quantitative (voir quatrième partie). Nous avons recueilli en outre des renseignements utiles pour la compréhension et l'étude ultérieure des phénomènes.

Ce sont les molécules de masses les plus élevées qui se trouvent présentes dans les agrégats. Il résulte de cette observation que, même si les agrégats sont formés de molécules de taille identique, comme tendent à l'indiquer les résultats de JENNINGS, SCHUSTER et SPACH[2], les fonctions de distribution des masses moléculaires dans le système initial de molécules non agrégées et dans la fraction de molécules agrégées ne sont pas semblables lorsque le taux d'agrégation est différent de l'unité. Le calcul du nombre moyen $\bar{n}$ de molécules par agrégat, dans l'article cité ci-dessus est entaché, de ce fait, d'une certaine erreur par excès. De ce fait on peut prévoir que la valeur du rayon de giration passe par un minimum au cours de la désagrégation, à condition que les molécules restent parfaitement rigides.

Nous avons montré que la précipitation n'affecte pratiquement pas les molécules présentes dans les agrégats, mais uniquement les molécules libres. Le phénomène d'agrégation ne précède donc pas la précipitation contrairement à ce que certains auteurs avaient pensé.

Etant donné l'insolubilité du précipité et le fait que ce sont les molécules ayant les plus faibles masses qui s'y trouvent incluses, il est tentant d'identifier la structure des molécules précipitées à une structure étirée de type β ; ce sera une des hypothèses de départ de la troisième partie de notre étude. Enfin nous avons remarqué qu'une molécule de PALG en solution aqueuse, à température ordinaire et à faible pH, se trouve dans un état métastable dont l'évolution peut se faire soit vers l'agrégation, soit vers la précipitation. La masse moléculaire joue un rôle important dans cette évolution.

Troisième Partie

ETUDE DE LA PRECIPITATION ET DU PRECIPITE

I. Manifestation du phénomène de précipitation

Nous avons montré dans la partie précédente la différence entre la précipitation et l'agrégation des molécules en solution. Nous avons effectué une étude plus détaillée du précipité en analysant sa composition, en mesurant sa vitesse de formation et l'influence de certains facteurs sur cette vitesse et en comparant les masses moléculaires précipitées en fonction du temps.

Les précipités ont la particularité de coller aux fonds et sur les parois des récipients ; ils sont recueillis la plupart du temps par simple décantation, séchés sous vide, puis lavés à l'eau sur un verre fritté et resséchés sous vide.

A. Analyse élémentaire du précipité

En solution à pH 4,4 (0,1 N NaCl ou 0,1 N Na_2SO_4), MICHAELI[32] trouve que 20 % des groupes latéraux sont ionisés (ce qui correspond à 3 % de sodium lors de l'analyse). Nous avons fait faire plusieurs analyses chimiques de précipités non lavés à l'eau ; nous donnons dans la colonne 1 du tableau III le résultat d'une analyse d'un précipité provenant d'une solution 0,1 M CH_3COONa-KCl à pH 4,4.

Le potassium a aussi été dosé : 2,05 % ; sur un même précipité, nous avons fait doser le chlore en même temps que les deux métaux alcalins, ce qui nous a montré que le pourcentage de chlore correspond à celui du potassium ; dans le cas présent, on le calcule : 1,86 %. On a alors par différence le pourcentage d'oxygène. A partir de là, on fait deux hypothèses extrêmes :

1) Le PALG précipité est entièrement sous forme acide et tout le sodium provient de l'acétate entraîné de la même façon que le KCl.

Tableau III

Résultats de l'analyse chimique et comparaison avec les valeurs de référence

numéro de la colonne	1	2	3	4	Valeurs de référence 5	6	7	8	9
	Précipité non lavé	PALG x H_2O	PALG y H_2O	Précipité lavé	PALG anhydre	PALG 0,15 H_2O	PALG 0,28 H_2O	PALG 0,50 H_2O	PALG 1 H_2O
C	43,16	45,5	45,2	43,8	46,5	45,5	44,8	43,4	40,8
H	5.91	6.2	6.3	5.6	5.4	5.5	5.6	5.8	6.2
N	9,84	10,6	10,3	10,1	10,8	10,6	10,4	10,1	9,5
O	36,29	37,7	38,2	39,5	37,2	38,3	39,2	40,6	43,4
Na	0,89	-	-	-	-	-	-	-	-

2) Tout le sodium provient de polyglutamate de sodium.

- Dans le premier cas, il faut retrancher des chiffres de la colonne 1 ceux relatifs à l'acétate de sodium calculés à partir du pourcentage de sodium ; on ramène alors à 100 % le total des pourcentages du polypeptide précipité et on obtient alors les chiffres de la colonne 2, que l'on compare à ceux des colonnes 5 à 9 ; en se basant uniquement sur les pourcentages de carbone et d'azote et en admettant que le produit n'est pas parfaitement anhydre, on obtient pour formule PALG - 0,15 H_2O à laquelle correspond la composition centésimale reportée dans la colonne 6. Dans ce cas, le précipité est un mélange de polymère hydraté et de 7 % de sels (CH_3COONa-KCl).

- Dans le second cas, on retranche les pourcentages dûs au polyglutamate de sodium des chiffres de la colonne 1 ; on ramène à 100 % le total des pourcentages du polypeptide précipité non-ionisé, ce qui donne les chiffres de la colonne 3. Les pourcentages de carbone et d'azote donnent comme formule PALG - 0,21 H_2O et PALG - 0,36 H_2O. Dans ce cas, le précipité est formé de PALG - 0,28 H_2O avec 6 % de polyglutamate de sodium et 4 % de chlorure de potassium.

Même dans ce deuxième cas, le pourcentage d'ionisation du précipité est très inférieur à celui de la solution, ce qui va dans le sens de ce qu'affirme MICHAELI : il y a déionisation coopérative lors de la précipitation. On devrait donc observer un accroissement du pH de la solution et c'est ce que l'on observe effectivement (voir paragraphe B 4).

Le cas réel peut être intermédiaire entre les deux cas extrêmes décrits ci-dessus puisqu'il n'y a aucune raison pour que KCl soit entraîné et pas CH_3COONa ; part ailleurs, la

composition centésimale du précipité lavé abondamment à l'eau (colonne 4) est plutôt en faveur de la première hypothèse.

La présence d'eau d'insertion est confirmée par les spectres infra-rouges, sur lesquels on voit un épaulement vers $3500cm^{-1}$ dû aux bandes d'absorption de l'eau ; cet épaulement disparait après chauffage à 150°C sous vide poussé, sans provoquer un autre changement dans le reste du spectre IR.

B. Influence de différents facteurs sur la vitesse de formation du précipité

1. Influence du pH

Trois solutions de même concentration mais à des pH différents (4,5 - 4,3 - 4,2) ont été préparées dans les mêmes conditions thermiques (solutions non agrégées) ; la photographie prise après deux jours montre que la précipitation est d'autant plus rapide, que le pH est plus bas.

2. Influence de la concentration

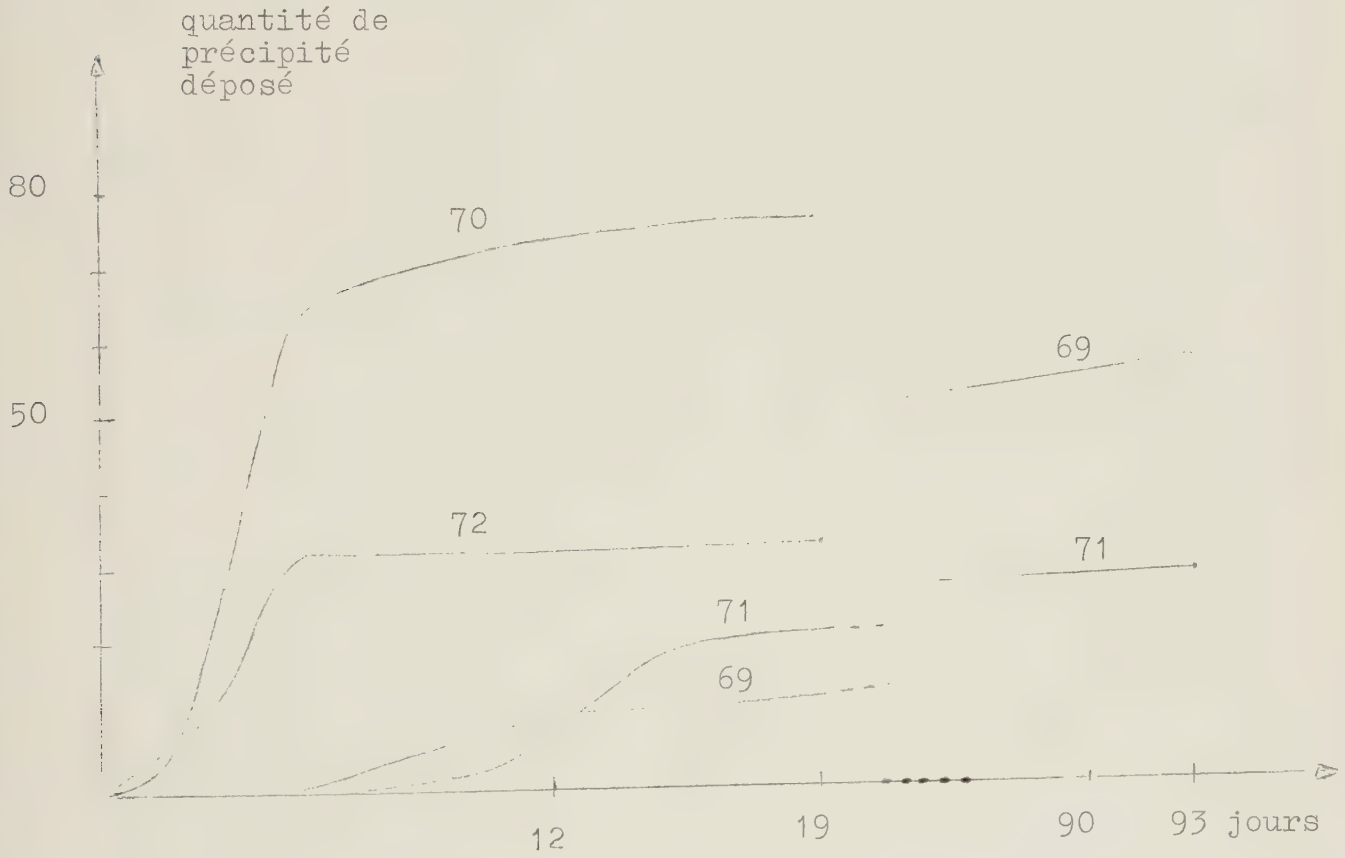
Même des solutions très diluées (c = 0,05 %) peuvent précipiter au cours du temps ; cependant un fait évident est que plus la solution est concentrée, plus rapide sera la précipitation (toutes choses égales par ailleurs).

3. Influence de la température

Sur la figure suivante nous reportons une expérience comparative assez grossière (même échantillon M_w = 37.000 et pH = 4,4) qui met en évidence l'influence de la température et du milieu sur la vitesse de précipitation.

Précipitation à 50°C
- solution 70 tamponnée ($KCl-CH_3COONa$) c = 0,83 %
- solution 72 non tamponnée (NaCl) c = 1,03 %

Précipitation à température ambiante
- solution 69 tamponnée c = 0,83 %
- solution 71 non-tamponnée c = 1,03 %



De cette expérience, nous pouvons tirer plusieurs conclusions :

- la vitesse de précipitation est plus élevée à 50°C pour les deux types de solutions

- bien que le précipité apparaisse en premier dans la solution non tamponnée à 50°C, il se dépose beaucoup plus vite dans la solution tamponnée

- il y a un palier pour les courbes des solutions non tamponnées : la vitesse de précipitation devient quasiment négligeable au bout d'un certain temps. Cela provient du fait que le pH a augmenté de telle façon que l'on sort du domaine de précipitation. Par exemple, au 12 ème jour, la solution 70 tamponnée a un pH égal à 4,59 et la solution 72 non tamponnée a un pH égal à 4,71 bien que cette dernière ait moins précipité, (voir tableau qui suit). Les accroissements de pH sont bien supérieurs aux incertitudes des mesures de pH.

	Sol.	pH initial à 23°C	temp.de précipitation	après 93 jours		après 12 jours		Δ pH
				pH	% précipité	pH	% Précipité	
tamponnées	69	4,40	25°C	4,43	54 %			+ 0,03
	70	4,40	50°C			4,59	70 %	+ 0,19
non tamponnées	71	4,40	25°C	4,54	26 %			+ 0,14
	72	4,40	50°C			4,71	30 %	+ 0,31

4. Influence d'autres facteurs

a) Des expériences ont montré que plus la force ionique est élevée, plus la vitesse de précipitation est faible.

b) Signalons que la vitesse de formation dépend encore de certains facteurs autres que ceux, signalés ci-dessus, et dont la nature n'est pas connue ; par exemple, deux solutions du même échantillon, dans les mêmes conditions de pH, de concentration de température et de milieu, donnent des courbes représentant la quantité de précipité formé en fonction du temps, non superposables ; dans un cas, la précipitation démarre beaucoup plus vite que dans l'autre, puis ralentit. On peut penser que la formation de germes catalysée par des impuretés dépend de l'état des récipients.

5. Conclusion

Il semble que les facteurs influençant la vitesse de formation du précipité et sur lesquels on peut agir sont les suivants : l'état structural et l'état d'ionisation des molécules en solution. L'influence de la température peut être reliée à l'état structural : moins il y a de formes hélicoïdales (en élevant la température), plus il y a de précipité qui se forme. L'influence du pH se résume à la compétition de deux facteurs qui ont des influences contraires ; plus le pH est bas, plus il y a de formes hélicoïdales et plus le degré d'ionisation est faible ; c'est l'état d'ionisation qui l'emporte, ce qui est à rapprocher des résultats de l'analyse chimique. Les molécules agrégées sont si l'on peut dire protégées, leur état structural empêche la précipitation.

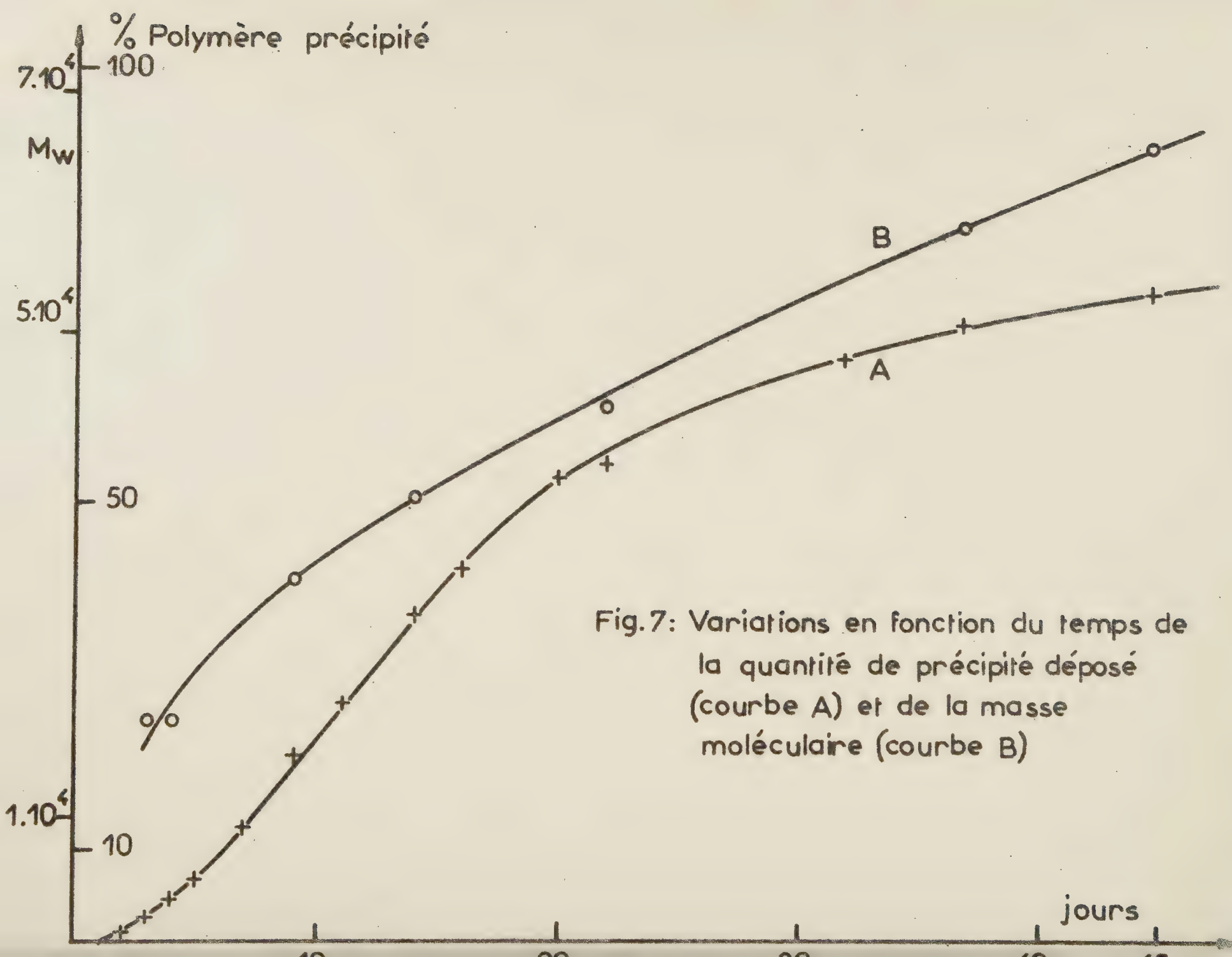


Fig. 7: Variations en fonction du temps de la quantité de précipité déposé (courbe A) et de la masse moléculaire (courbe B)

Comme les résultats de la deuxième partie montraient que c'étaient les molécules de plus faibles masses qui précipitaient, il nous a paru intéressant de faire une étude plus quantitative de ce facteur.

C. Masses moléculaires

Pour pouvoir avoir une idée des masses moléculaires des différentes fractions de précipité qui se déposent au cours du temps, nous sommes partis d'une quantité plus importante de polymère (1,8 g) et nous avons étudié tout d'abord les quantités de précipité déposées en fonction du temps sur une solution de molécules non-agrégées, à pH 4,35. Si l'on trace la courbe des quantités cumulées en fonction du temps, on obtient comme précédemment une courbe sigmoïdale dont la première partie est fortement croissante (voir figure 7A). Sur les fractions, nous avons calculé la masse moyenne en poids à l'aide de mesures de viscosité ; ces masses sont reportées sur la figure 7B ; la masse moléculaire est fonction croissante du temps. A partir des deux courbes précédentes, on peut tracer la courbe intégrale ou la courbe différentielle de distribution des masses moléculaires ; on peut calculer les masses moyennes en poids et en nombre[33] de l'échantillon brut et les reporter sur la courbe différentielle (figure 8). La masse moyenne en poids est 47.000 et celle en nombre 37.000 ; le rapport M_w/M_n, qui est une mesure de la polydispersité, a pour valeur 1,27 ; or, nous avons rapporté dans la première partie (paragraphe II) que ce rapport devait être supérieur à 2 dans le cas du polyacide ; de plus la masse moyenne en poids de l'échantillon initial était de 100.000. Il y a donc une contradiction dont nous donnerons l'explication dans la cinquième partie.

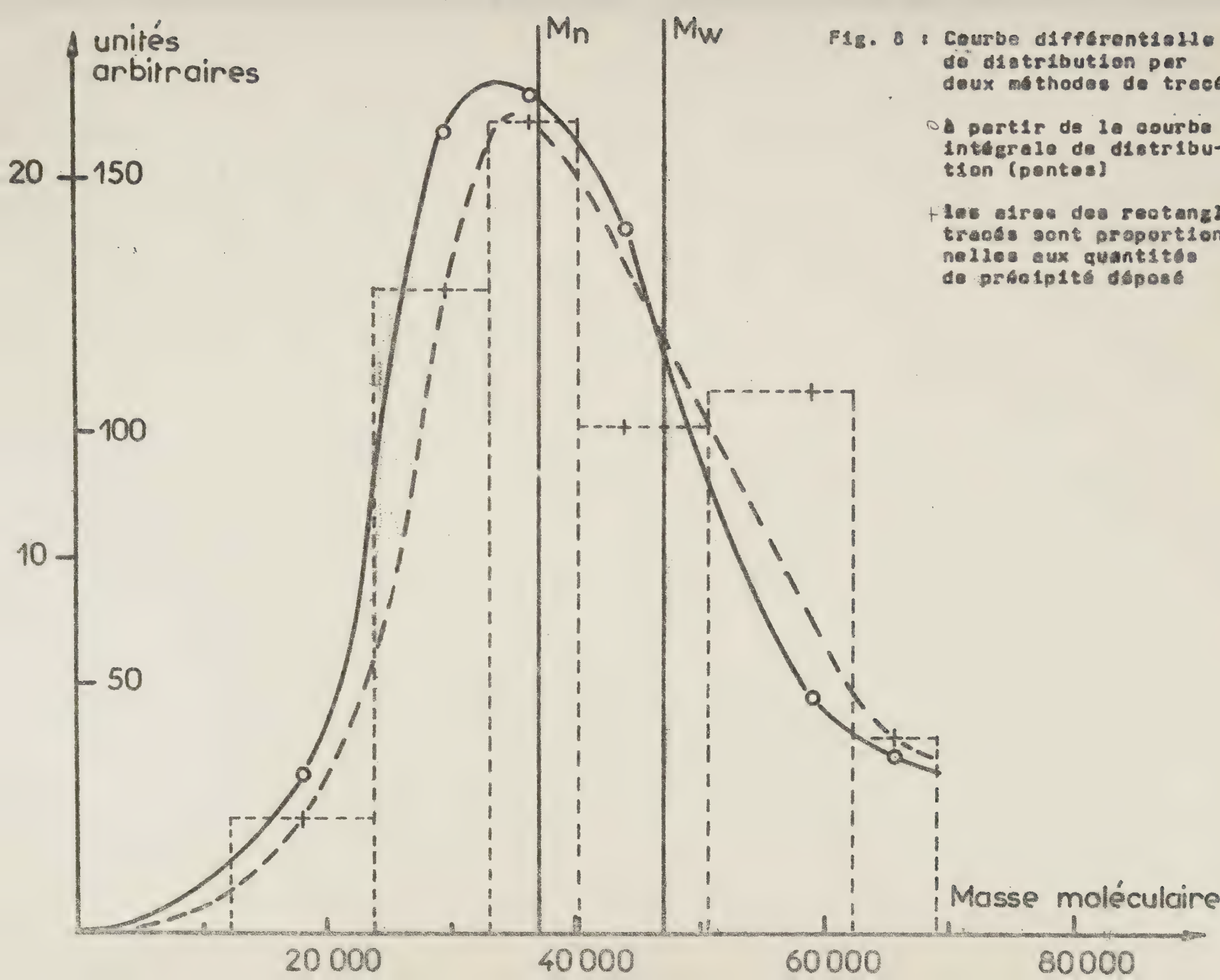


Fig. 8 : Courbe différentielle de distribution par deux méthodes de tracé

o à partir de la courbe intégrale de distribution (pentes)

+ les aires des rectangles tracés sont proportionnelles aux quantités de précipité déposé

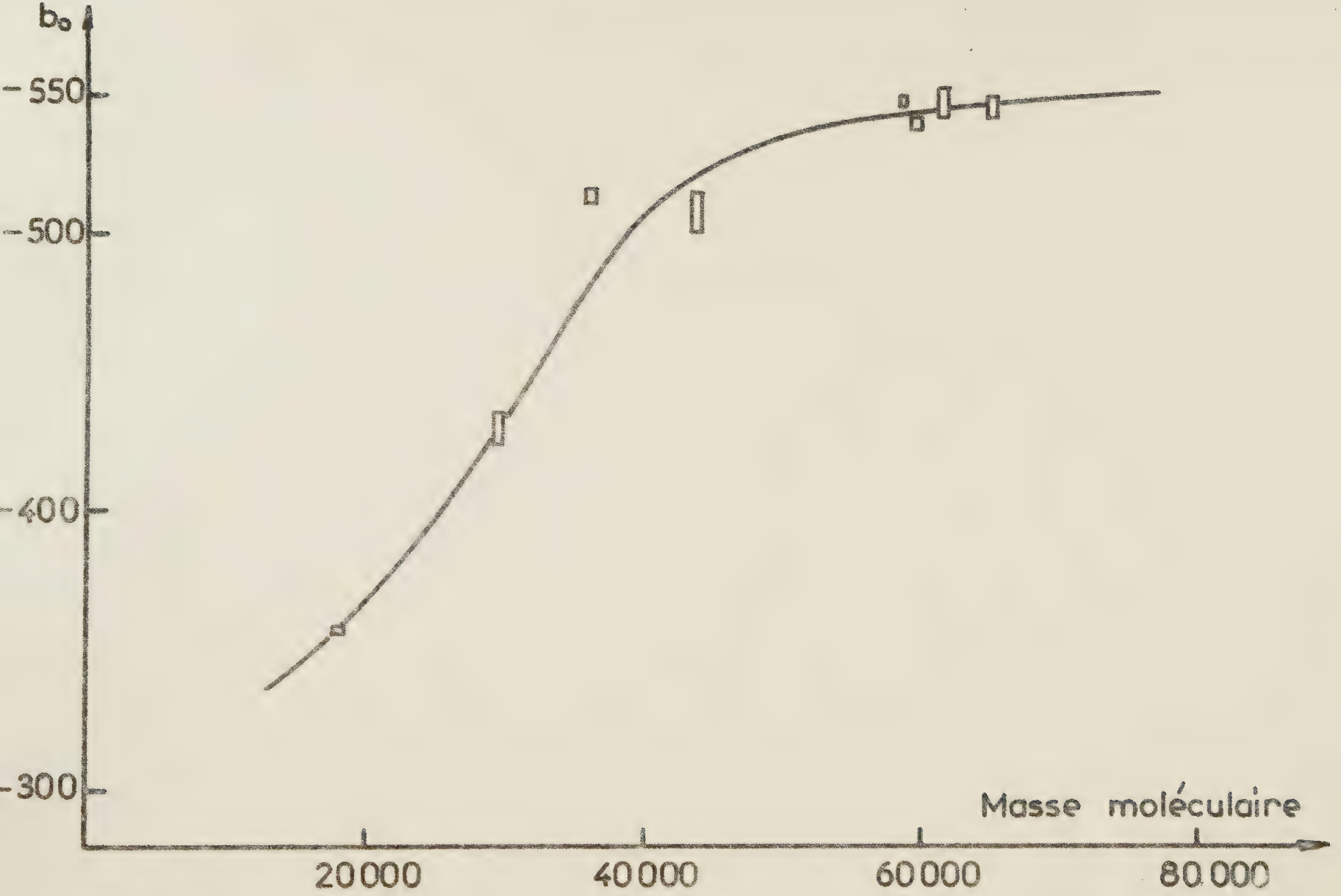


Fig. 9 : Variation du coefficient b_o en fonction de la masse moléculaire

D. Propriétés des solutions de molécules ayant précipité

Comme nous disposions de fractions de masses moléculaires différentes, il était intéressant de les étudier en dispersion optique rotatoire, afin d'avoir la variation du facteur d'hélicité b_o (deuxième coefficient de l'équation de MOFFITT) en fonction de la masse. Nous avons utilisé les solutions employées précédemment pour les mesures de viscosité, les conditions expérimentales sont un peu différentes de celles de JENNINGS : force ionique 0,2 M NaCl, concentration 0,2 à 0,3 %, pH 4,4. Toutes ces solutions ont été portées à 4°C pendant 48 heures, afin que nous puissions déterminer si du polymère ayant précipité peut s'agréger quand on le remet en solution et que l'on fait subir à cette solution le traitement thermique adéquat.

Sur la figure 9, nous avons reporté les variations de b_o en fonction de la masse ; pour les masses de l'ordre de 60.000, b_o atteint une valeur de - 540, - 550 ; pour les masses de l'ordre de 20.000, b_o est environ - 350 ; ceci nous donne une idée de l'état structural des molécules avant précipitation : quelle que soit la masse moyenne, il y a toujours une partie des molécules sous forme hélicoïdale, mais plus la masse moyenne est faible, plus faible est le taux moyen d'hélicité. Bien que ces valeurs de b_o soient entachées d'une erreur dûe aux concentrations on peut calculer le taux d'hélicité en prenant pour 100 % de forme hélicoïdale b_o égal à - 550 et pour 0 % b_o égal à 0. Il semble qu'il y ait un domaine de masses moléculaires (20.000 à 35.000) où le taux d'hélicité varie rapidement ; il serait intéressant de reprendre ce même genre de manipulation avec des échantillons de polydispersité encore plus faible.

Nous avons comparé l'amplitude du cycle d'hystérésis en pouvoir optique rotatoire à 365 nm et à 23°C avant et après

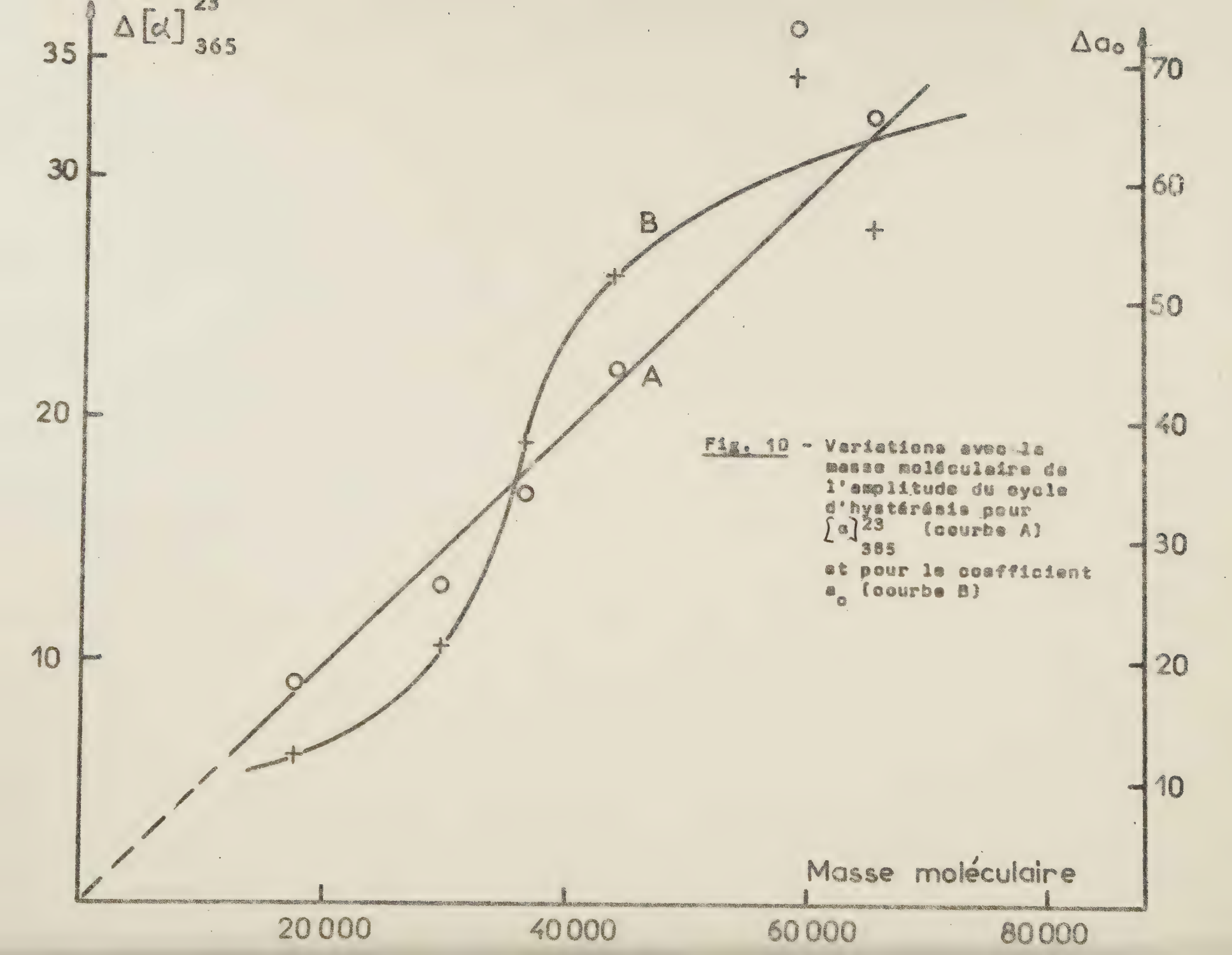


Fig. 10 - Variations avec la masse moléculaire de l'amplitude du cycle d'hystérésis pour $[\alpha]^{23}_{365}$ (courbe A) et pour le coefficient a_o (courbe B)

chauffage ($\Delta[\alpha]_{\frac{23}{365}}$) ainsi que l'amplitude Δa_o de la variation du coefficient a_o pour les différentes masses. Sur la figure 10 nous voyons que l'amplitude de la boucle d'hystérésis de $[\alpha]$ et de a_o croît avec la masse moyenne des fractions ; or on verra dans la quatrième partie que le pourcentage d'agrégats croît avec la masse ; il en résulte que la valeur de $\Delta[\alpha]$ est une fonction du pourcentage d'agrégats. Nous voyons qu'il y a un domaine de masses moléculaires (30.000 à 40.000) où Δa_o subit une variation brutale ; ce domaine recouvre la fin du domaine où le taux d'hélicité augmente rapidement pour atteindre 100 %, ce qui veut dire que le phénomène d'agrégation s'accélère à partir du moment où la majorité des molécules est sous forme hélicoïdale.

II. Structure du précipité

Dans la conclusion de la deuxième partie, nous avons émis l'idée que, la formation du précipité étant irréversible, il devrait y avoir changement de structure lors de la précipitation et passage d'une forme hélicoïdale ou chaîne statistique à une forme étirée β ou réticulée ; la solubilité du précipité dans différents solvants donne une autre indication.

A. Comparaison de solubilités d'échantillons bruts et de précipités

Le précipité, comme le PALG, n'est pas soluble dans l'eau ; on peut le transformer en sel de sodium avec une quantité équimoléculaire de soude.

Le précipité n'est pas soluble dans le diméthylformamide, tandis que le polymère brut est généralement soluble, ce qui indique pour ce dernier qu'il n'adopte pas une structure β .

Tableau IV

Principales bandes d'absorption infra-rouge

Désignation des bandes	Echantillon brut	Précipité
Amide A (vibration de valence de N-H)	3280 cm^{-1}	3340 cm^{-1} (F) + épaulement 3280 cm^{-1} (f)
Amide B (vibration de valence de N-H)	3080 cm^{-1}	épaulement à 3200 cm^{-1} 3080 cm^{-1}
Vibration du C = O du groupement latéral carboxylique	1715 cm^{-1}	1730 cm^{-1} + épaulement à 1715 cm^{-1}
Amide I (vibration de valence du C = O peptidique)	1640 cm^{-1}	1640 cm^{-1} (f) 1600 cm^{-1} (F)
Amide II	1540 cm^{-1} + épaulement à 1520 cm^{-1}	1540 cm^{-1} + épaulement à 1520 cm^{-1}
vibrations du groupement latéral ($-CH_2-CH_2-$)	1400 cm^{-1} 1400 cm^{-1}	1400 cm^{-1} 1400 cm^{-1}

Un échantillon brut de PALG se dissout entièrement dans l'acide trifluoro acétique (ATF) à température ambiante très rapidement. Dans les mêmes conditions, le précipité ne se dissout pas, (même après agitation de plusieurs jours). Par contre un précipité chauffé à 45 - 50°C avec agitation pendant au moins 24 heures se dissout partiellement.

Conclusion

Cette différence de solubilité donne une première indication : la structure est différente de celle du PALG brut dont la conformation habituellement admise est hélicoïdale. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous avons employé deux techniques d'étude de l'état solide, c. à d. l'infra-rouge et les rayons X.

B. Spectres d'absorption infra-rouge

Dans le tableau IV, nous avons mis en regard les principales bandes caractéristiques du polymère brut et du polymère précipité. Il ressort de cette comparaison qu'il y a un dédoublement de ces bandes pour la forme précipitée : une série de bandes se trouve aux positions habituelles, c. à d. comme dans le polymère brut, et une deuxième série à des positions décalées Entre les différents spectres de précipités correspondant à différents échantillons, on peut observer des variations d'intensité relatives des deux types de bandes. Il apparaît donc qu'il y a deux formes structurales en présence que nous avons appelées :

- forme I caractérisée par les bandes à 3340 - 1730 et 1600 cm^{-1}
- forme II caractérisée par les bandes à 3280 - 1715 et 1640 cm^{-1}

Nous avons essayé d'isoler la forme I pure soit en dissolvant la forme II, soit en agissant sur les conditions de formation du précipité ; la solubilité partielle à chaud du précipité dans l'acide trifluoroacétique n'est pas liée à la solubilité préférentielle de la forme II ; nous n'avons pas trouvé de corrélation entre le rapport forme I sur forme II et la masse moléculaire, ce qui aurait été facile à voir puique la précipitation est un fractionnement ; nous avons laissé précipiter des solutions à divers pH , forces ioniques et températures sans remarquer de variation monotone dans le rapport forme I/forme II du précipité.

Il n'y a pas de différence entre un spectre d'un précipité d'une solution tamponnée et celui d'un précipité d'une solution non tamponnée, ce qui confirme l'analyse chimique montrant qu'il y a peu d'acétate de sodium entraîné.

D'autre part, il n'est pas possible d'obtenir des échantillons orientés sans détruire la structure ; aussi devons-nous nous contenter de ces résultats obtenus avec le polymère précipité.

En conclusion, il y a probablement deux formes de structures, mais elles affectent les mêmes molécules.

Nous allons maintenant examiner bande par bande, le spectre infra-rouge du précipité (figures 11 et 12, sauf pour les bandes en dessous de 650 cm^{-1}).

1) Bande amide A

La bande centrée vers 3280 cm^{-1} est due à la vibration d'allongement du groupement N-H. Les rares renseignements que l'on trouve dans la littérature sur cette bande nous indiquent qu'elle occupe à peu près la même place dans l'hélice et dans

Fig. 11: Spectre d'absorption infra-rouge du précipité

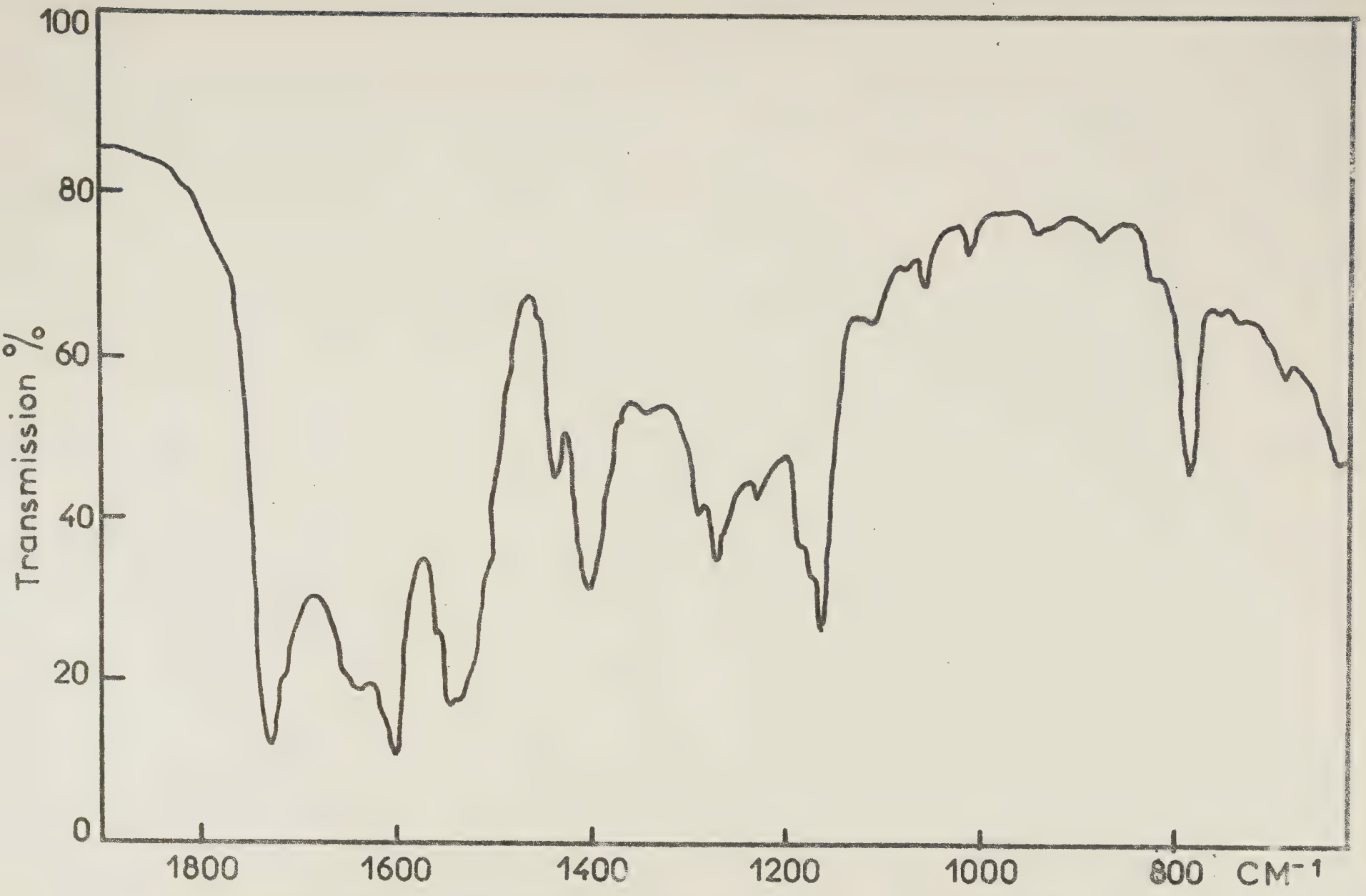


Fig. 12 Spectre d'absorption infra-rouge du précipité

la structure étirée β (avec des dichroïsmes inverses). Dans ces deux formes, il y a une liaison N-H ... O = C ; elle est intra-moléculaire dans le premier cas et intermoléculaire dans le second (C = O étant dans les deux cas le groupement carbonyle de la chaîne polypeptidique). Dans le cas des amides secondaires en solutions diluées [34a] ou de la polycarbobenzoxy-DL-lysine [34b] (qui a des groupements N H et C O à la fois dans la chaîne principale et dans la chaîne latérale), la bande amide A est située vers 3450 cm^{-1} et on en déduit que les groupes N-H ne sont pas liés. Le cas de la bande amide A des polypeptides sous forme de chaîne statistique est pratiquement passé sous silence dans la littérature. Nos spectres infra-rouge en pastille de K Br du PLGNa (Pilot) présentent une large bande centrée vers 3420 cm^{-1} et un épaulement vers 3280 cm^{-1}.

Dans le cas du précipité, et, pour la forme I, la bande à 3340 cm^{-1} indique que le groupe N-H est soit lié moins fortement avec le carbonyle peptidique que dans le cas des hélices α ou des formes β, soit lié avec un groupe carbonyle appartenant à une fonction non peptidique. La forme II présente l'épaulement à 3280 cm^{-1}.

2) Bande Amide B

La bande Amide B est également due à la vibration d'allongement du groupe N-H ; elles est située habituellement à 3080 cm^{-1} et est moins intense que la bande Amide A ; dans le cas du précipité, on a un deuxième épaulement situé à 3200 cm^{-1}, non identifié.

3) Bande entre 2900 et 2940 cm^{-1}

On attribue cette bande à la vibration asymétrique de valence des atomes d'hydrogène des groupements CH_2 [34c] ; elle est visible dans le spectre du sel de sodium.

4) Massif entre 2500 et 2700 cm^{-1}

Ce massif d'absorption a une position caractéristique due à la vibration du groupe O-H d'un acide carboxylique fortement lié par liaison hydrogène [34 d] ; on ne peut observer de différence entre les précipités et les échantillons bruts, vu la faible intensité et l'étalement des bandes ; notons qu'il n'y a rien dans cet intervalle de fréquence sur le spectre du sel de sodium.

La vibration d'allongement du groupe OH libre donnerait une bande située entre 3500 et 3560 cm^{-1} ; malheureusement dans cette région il y a un épaulement plus ou moins intense dû à des vibrations des molécules d'eau absorbées.

5) Bande due à la vibration du C = O du groupe carboxylique

En solution (H_2O - dioxanne) ou en film, les différents auteurs[35,36,3] observent une bande entre 1700 et 1710 cm^{-1} (non-dichroïque) qui correspond à la vibration C = O du groupe carboxylique non-ionisé ; à l'état solide sur les échantillons bruts, nous observons une bande assez large centrée vers 1715 cm^{-1} il est communément admis que certains groupements carboxyliques latéraux sont liés entre eux par liaison hydrogène inter ou intramoléculéculairement dans les formes α ou β . Il est intéressant dans notre cas de noter que la position de cette bande

de valence est différente dans les deux formes : 1715 cm^{-1} pour la forme II et 1730 cm^{-1} pour la forme I.

6) Bande Amide I

La bande due à la vibration d'allongement du groupement - CO de la chaîne principale est située : - entre 1640 - 1660 cm^{-1} pour la forme hélicoïdale α et la chaîne statistique; - entre 1620 - 1635 cm^{-1} pour la forme étirée β anti-parallèle, associée avec une faible bande à 1690 cm^{-1}[38].

La position à 1600 cm^{-1} de la bande Amide I pour la forme I est la plus faible valeur jamais observée pour un polypeptide et ne peut être attribuée à la vibration du groupement carboxylate, car ce dernier se trouve en quantité négligeable dans le précipité.

E.M. BRADBURY et collaborateurs[37] signalent cette bande à 1600 cm^{-1} en présence de celle à 1640 cm^{-1} dans un spectre d'une solution de PALG à 50°C et ils l'attribuent à des agrégats de molécules de forme β .

Dans les spectres des précipités, nous avons toujours observé un épaulement vers 1690 cm^{-1}, mais dans les spectres des échantillons bruts, cette bande existe aussi et est même plus importante. La présence de cet épaulement n'est donc pas significative.

7) Bande Amide II

Le cas de cette bande est plus complexe, puisque nous n'avons pas deux bandes distinctes ; nous avons un massif entre 1500 et 1580 cm^{-1} analogue pour les précipités et pour les échantillons bruts, avec un maximum à 1540 cm^{-1} et un épaulement

important à 1520 cm^{-1}. On sait que la bande Amide II est due d'une part, à la vibration de déformation de la liaison N-H et d'autre part, à la vibration d'allongement de la liaison C-N. Elle est située entre 1530 cm^{-1} et 1558 cm^{-1} pour la forme hélicoïdale α , et entre 1515 cm^{-1} et 1526 cm^{-1} pour la forme étirée β [38].

8) Bandes à 1400 et 1440 cm^{-1}

Ces deux bandes sont visibles sur les spectres des précipités et des échantillons bruts ; elles sont dues aux vibrations de déformation des groupements hydrocarbonés du polymère et l'intensité de la bande à 1400 cm^{-1} est toujours supérieure à celle de 1440 cm^{-1} ; dans le cas du sel de sodium la bande de vibration asymétrique du groupement carboxylate vient se superposer à 1400 cm^{-1}.

9) Bandes entre 1400 et 800 cm^{-1}

Entre 1300 et 1100 cm^{-1}, on distingue:

- dans le spectre du précipité, deux bandes d'intensités moyennes à 1270 et 1165 cm^{-1} et une bande de faible intensité à 1235 cm^{-1}

- dans le spectre de l'échantillon brut, un massif avec trois maxima : 1240 - 1200 - 1160 cm^{-1}

- dans le spectre du sel de sodium, un seul extremum vers 1240 cm^{-1}

D'après BELLAMY [34 e], le couple de bandes 1270 - 1235 cm^{-1} ~~du précipité~~ est lié à la fonction acide carboxylique, et la bande à 1270 cm^{-1} peut être attribuée au couplage des vibrations de déformation dans le plan des groupes C = O et OH.

D'après MIZUSHIMA[39] on retrouve le couple de bandes à 1280 - 1230 cm^{-1} dans la plupart des polypeptides et la bande à 1280 cm^{-1} est attribuée à la déformation du N H dans le plan et à l'allongement de CN.

Dans le cas des échantillons bruts, le spectre est trop mal défini pour que l'on puisse attribuer les maxima du massif à des vibrations et on ne peut faire aucune comparaison.

10. Bandes entre 800 et 500 cm^{-1}

A 790 cm^{-1}, il y a un pic d'absorption dans le spectre du précipité que l'on retrouve à l'état de toute petite bande dans le cas des échantillons bruts.

A 700 cm^{-1}, on observe dans les deux cas une petite bande d'absorption.

Dans le spectre des échantillons bruts, on a un massif d'absoprtion avec un maximum vers 615 cm^{-1} et un épaulement vers 640 cm^{-1} ; dans le cas du précipité, on a un pic à 630 cm^{-1}.

MIYAZAWA[40] a étudié les bandes dites Amide V situées entre 600 et 700 cm^{-1} ; en effet, la forme hélicoïdale α et la forme désordonnée présentent des bandes Amide I et Amide II similaires ; le résultat des travaux de MIYAZAWA peut être résumé comme suit :

- bande à 700 cm^{-1} : forme étirée (β)
- bande à 650 cm^{-1} : forme désordonnée
- bande à 620 cm^{-1} : forme hélicoïdale α

Cette classification n'a pas encore pu être confirmée expérimentalement.

Discussion

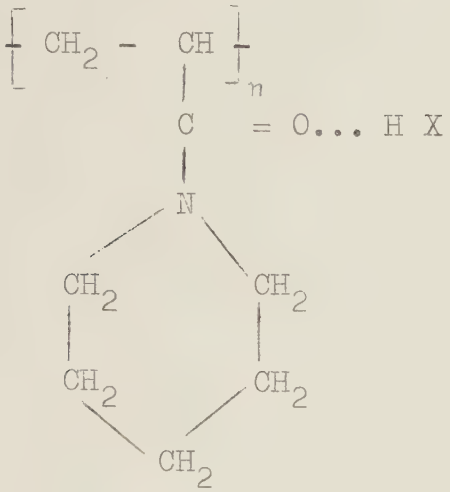
Au terme de cette description détaillée du spectre infra-rouge du précipité, il s'agit maintenant d'essayer de faire la corrélation avec la structure.

Au cours de l'étude des agrégats en solution, nous avons préparé des solutions de PALG dans l'eau lourde qui ont précipité au cours du temps. Le spectre infra-rouge du précipité recueilli est analogue à celui des autres précipités, à ceci près que, comme on pouvait s'y attendre, les bandes Amide II et Amide A sont déplacées vers les plus faibles fréquences mais en partie seulement du fait de la deutération incomplète ; le fait que la bande d'absorption située à 1600 cm^{-1} ne soit pas du tout déplacée confirme qu'elle est bien due à la vibration du CO peptidique.

Rassemblons d'abord les faits principaux de cette étude infra-rouge ; pour la forme I et par rapport à la forme II les bandes associées aux vibrations de valence Amide A et Amide I sont déplacées l'une vers les plus fortes fréquences, l'autre vers les plus faibles fréquences, la bande Amide II n'est pas déplacée, la bande de vibration du C = O du groupement carboxyle est déplacée vers les plus fortes fréquences ; dans le cas de la poly-S-carbobenzoxy-L-cystéine[41] les bandes Amide A et Amide I sont déplacées dans le même sens et les auteurs ont attribué ce déplacement à une liaison - CO ...HN - plus relâchée ; ce n'est pas le cas ici.

La position de la bande Amide I de la forme I est comparable à celle d'un cas étudié par LASCOMBE et JOSIEN[42], qui trouvent que le massif d'absorption dû au groupement C = O de la polyacrylopipéridide se déplace de 1640 à 1600 cm^{-1} par

interaction avec l'acide acétique pour donner des complexes tels que :



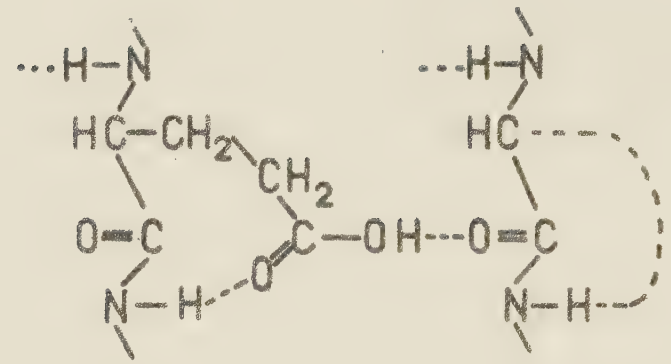
H étant l'hydrogène du groupe OH de l'acide acétique

L'analogie entre notre cas et celui-ci nous a amenés à penser que le groupe OH du carboxyle de la chaîne latérale de notre polymère peut se lier de la même façon à un carbonyle peptidique de la chaîne principale à laquelle est relié le groupe latéral ou à un carbonyle peptidique d'une chaîne voisine. Il faut alors admettre que le groupe CO du groupement carboxylique est lié au groupe NH peptidique.

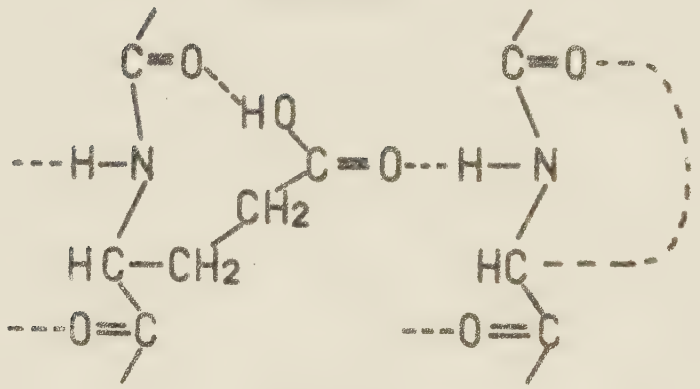
Nous avons cherché à construire des modèles qui tiendraient compte de ces faits.

Dans tout le raisonnement qui suit nous considérons que les liaisons peptidiques C = O et N - H sont en position trans l'une par rapport à l'autre.

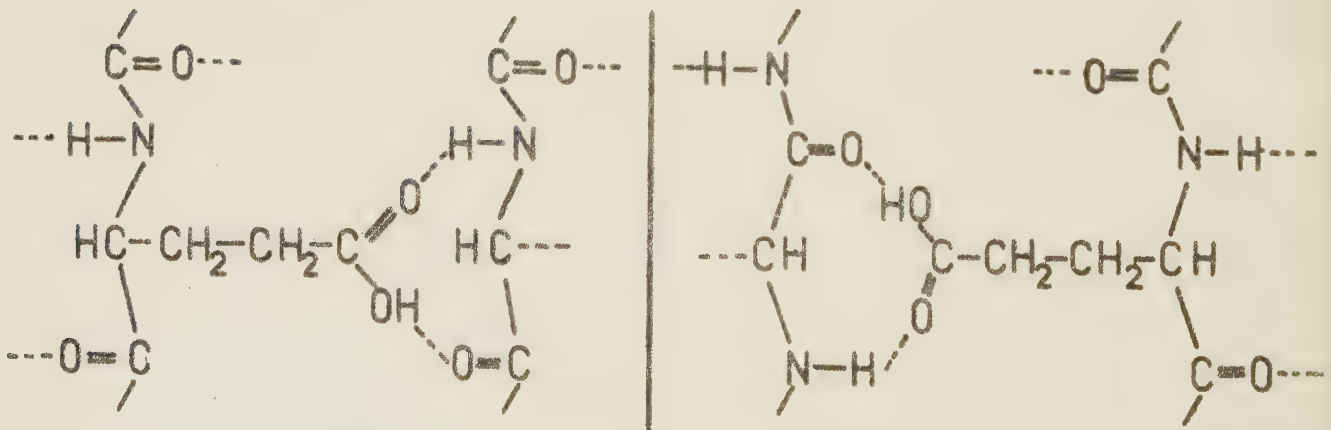
Dans la forme I du précipité, il y a trois possibilités pour l'hydrogène du groupement OH du carboxyle lié à un résidu d'une chaîne donnée :



a — c



b — d



a — d_{11} a — d_{12}

Fig: 13 Diverses possibilités de liaisons intermoléculaires par l'intermédiaire des groupements carboxyles

a) être lié au groupe carbonyle de la liaison peptidique d'une chaîne adjacente

b) être lié au groupe CO d'un résidu voisin, et il n'y a qu'un seul voisin possible stériquement, car le carbonyle de l'autre est trop éloigné.

c) être lié au groupe CO du résidu auquel est attaché la chaîne latérale dont il fait partie

De même, il y atrois possibilités pour le groupement CO de l'acide carboxylique :

d) être lié au groupe NH d'une autre chaîne

e) être lié au groupe NH d'un résidu voisin (une seule possibilité)

f) être lié au groupe NH du même résidu

Puisque nous nous sommes placés dans le cas des liaisons CO et NH trans, les cas c et f deviennent très improbables

Il y a donc quatre combinaisons à envisager :

a - e, b - d, d - e et a - d

La combinaison b - e estàéliminer puisque le CO du carboxyle choisit le résidu voisin où le NH est plus proche et le OH du carboxyle obligatoirement l'autre où le CO peptidique est plus proche.

La combinaison a - d se scinde en deux :

le C O et le O H des groupements carboxyles sont :

- soit liés à la même chaîne ($a\text{-}d_1$)
- soit liés à deux chaînes différentes ($a\text{-}d_2$)

Sur la figure 13, nous avons représenté sur un plan les possibilités : a - e, b - d, a - d_{11} (chaînes parallèles) et

Tableau V : Distances réticulaires de diverses formes cristallines du PALG

Précipité		Echantillon brut		β-PALG (d'après PADDEN-KEITH)		β PALG	
à partir du PLGCa ou par précipitation à bas pH				par précipitation à bas pH		provenant du β - PLGCa	
d_{hkl} (Å)	Intensité	d_{hkl} (Å)	Intensité	d_{hkl} (Å)	Intensité	d_{hkl} (Å)	Intensité
7,8	M	9,8	M	7,80	M	8,65	M_f
4,7	MF	7,6	f	4,72	MF	4,62	F
3,9	F	4,6 (anneau de diffusion)	M	3,90	F	3,86	MF
3,6	f	3,8 (anneau de diffusion)	TF	3,58	M-diffuse		
3,2	Mf	3,5	f	3,30	Mf		
2,8	tf	3,0	tf	2,60	M		
2,6	Mf	2,7	ttf				
2,3	tf	2,5	tf				
distance plus petite	ttf						

a-d_{12} (chaînes anti-parallèles). Pour les combinaisons a - e et b - d, les chaînes sont parallèles ; les cycles formés sont à 8 atomes pour a - e, et à 9 atomes pour b - d, a-d_{11} et a-d_{12}.

Sur les modèles construits, nous voyons que la combinaison b - d laisse les chaînes adjacentes coplanaires, contrairement à la possibilité a - e, et elle est de plus beaucoup plus satisfaisante du point de vue stérique. De même, la possibilité a - d_{12} (chaînes anti-parallèles) est plus facile à construire avec les modèles que la possibilité a - d_{11} (chaînes parallèles). Ainsi l'étude des spectres d'absorption infra-rouge du précipité nous permet de proposer plusieurs types de structure ; nous allons essayer de voir si l'étude des diagrammes de diffraction des rayons X nous permet de faire avancer plus avant la détermination de la structure du précipité.

C. Diagramme de diffraction des rayons X

1. Résultats

Nous présentons dans le tableau V les résultats obtenus à partir des diagrammes de diffraction de poudre . Nos valeurs obtenues pour les précipités, sont reportées dans la première colonne ; dans la seconde, nous reportons les distances réticulaires trouvées pour un échantillon brut. Nous avons trouvé dans le diagramme de certains échantillons précipités une distance de 9,8 Å qui n'apparaît que très faiblement ou pas du tout (selon le degré d'exposition) sur les diagrammes du précipité obtenu en solution et qui apparaît faiblement et même, dans un cas, plus fortement que la distance 7,8 Å sur les diagrammes du PALG ~~provenant~~ obtenu à partir de polyglutamate de calcium ; cette distance réticulaire de 9,8 Å se retrouve dans le diagramme de

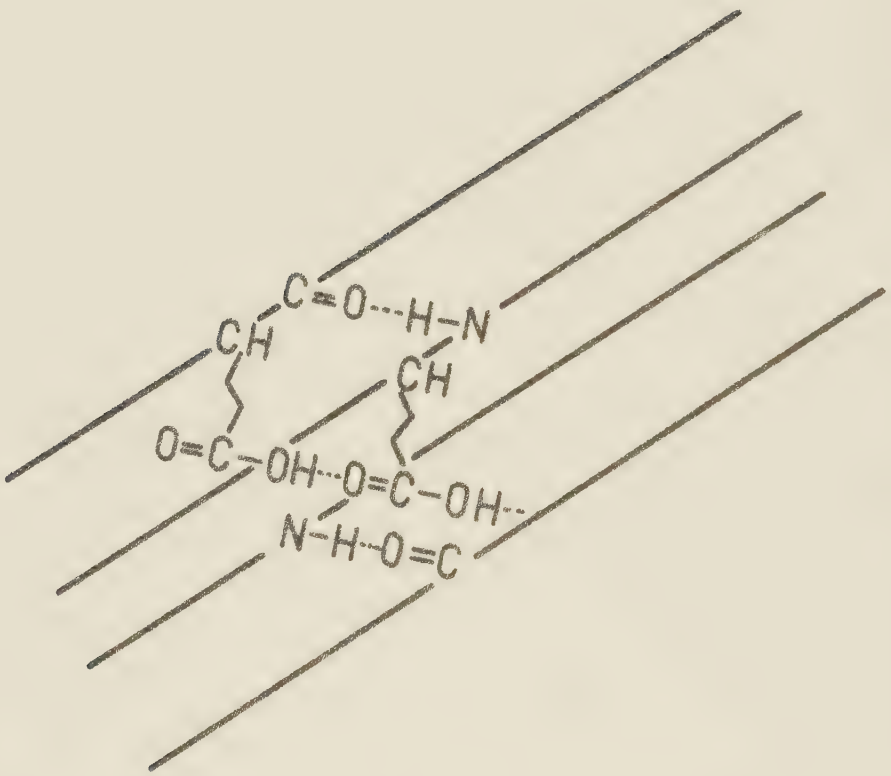


Fig. 14: Schéma du modèle structural proposé par PADDEN-KEITH pour le précipité de PALG

l'échantillon brut. Les spectres d'absorption infra-rouge montrent que la forme I (définie dans le précédent paragraphe) est prédominante dans le précipité obtenu à bas pH. Nous pensons que la raie correspondant à 9,8 Å est due à la forme II, qui ressemble à la structure ordonnée de l'échantillon brut, car les autres raies d'intensité forte ou moyenne de ce dernier ne sont pas à des positions suffisamment distinctes de celles des précipités pour que l'on puisse aussi les répérer. PADDEN et KEITH[43] ont décrit deux formes cristallines correspondant à des structures étirées qui diffèrent seulement par la distance réticulaire la plus grande (3° et 4° colonne du tableau V). Ce que nous avons obtenu correspond à une des deux formes décrites par PADDEN - KEITH.

2. Modèles proposés

Les structures proposées par les auteurs susnommés sont basées sur le modèle de chaînes antiparallèles arrangées en surface plissées et les motifs élémentaires sont monocliniques.

a) Dans le PALG préparé directement par précipitation des solutions aqueuses à bas pH, les groupements carboxyles sont disposés dans des plans normaux à la direction des chaînes ; les chaînes latérales s'emboîtent profondément et la distance entre les plans est de 7,8 Å (voir schéma simplifié sur la figure 14). Ce modèle qui correspond à ce que nous avons appelé forme I n'est pas en accord avec les hypothèses résultant de notre étude infra-rouge, à savoir que les chaînes principales du polymère ne sont pas liées directement entre elles, mais par l'intermédiaire des chaînes latérales. Toutefois, les deux sortes de modèles ne sont peut-être pas incompatibles ; d'après une communication personnelle de PADDEN - KEITH, il serait possible qu'il y ait réarrangement des liaisons hydrogène dans le cristal, mais ils continuent

à penser que la nucléation se fait selon leur modèle, c. à d. que les liaisons hydrogène sont entre les groupements carboxyles, à la fois à la surface des cristaux et dans les agrégats de structure β en solution. Le réarrangement à l'intérieur du cristal pourrait se faire une chaîne latérale sur deux en intercalant le groupement carboxyle entre le C = O et le NH peptidiques. Néanmoins, nous pensons que ce réarrangement perturberait la structure plus que ne le pensent PADDEN-KEITH.

b) En transformant le polyglutamate de calcium en PALG à l'état solide à l'aide de l'acide chlorhydrique 0,1 N, les groupements carboxyles conservent l'orientation des groupes carboxylates initiaux, c. à d. parallèles à l'axe de la chaîne, mais ils s'emboîtent de telle façon que la distance entre les plans diminue de 12,5 - 13 Å à 8,7 Å.

Nous avons fait cette préparation en vue principalement de tracer le spectre d'absorption infra-rouge, non décrit. Nous sommes partis de polyglutamate de calcium, dont le cliché de diffraction des R.X. indique des distances réticulaires identiques à celles rapportées par PADDEN-KEITH et dont le spectre infra-rouge confirme cette identité ; ce PLGCa est traité de la même façon par la suite ; nous avons refait trois fois cette expérience sans jamains retrouver les résultats de ces auteurs. Nous trouvons un cliché de diffraction des rayons X analogue à celui du précipité des solutions. De même, le spectre infra-rouge est très voisin de celui obtenu avec les précipités, à ceci près que la forme II est prépondérante ; or c'est dans ce cas précisément que la raie correspondant à la distance réticulaire de 9,8 Å apparaît nettement.

Pour conclure, nous pouvons dire que par absorption infra-rouge et diffraction des rayons X nous trouvons que le précipité est un ensemble de deux formes structurales dont l'une

est une forme étirée et dont l'autre est celle de l'échantillon brut ; par contre, nous ne trouvons pas une forme cristalline distincte décrite par PADDEN et KEITH pour le PALG provenant du PLGCa.

Quatrième Partie

ETUDE DES SOLUTIONS CONTENANT UNIQUEMENT DES MOLECULES AGREGEES

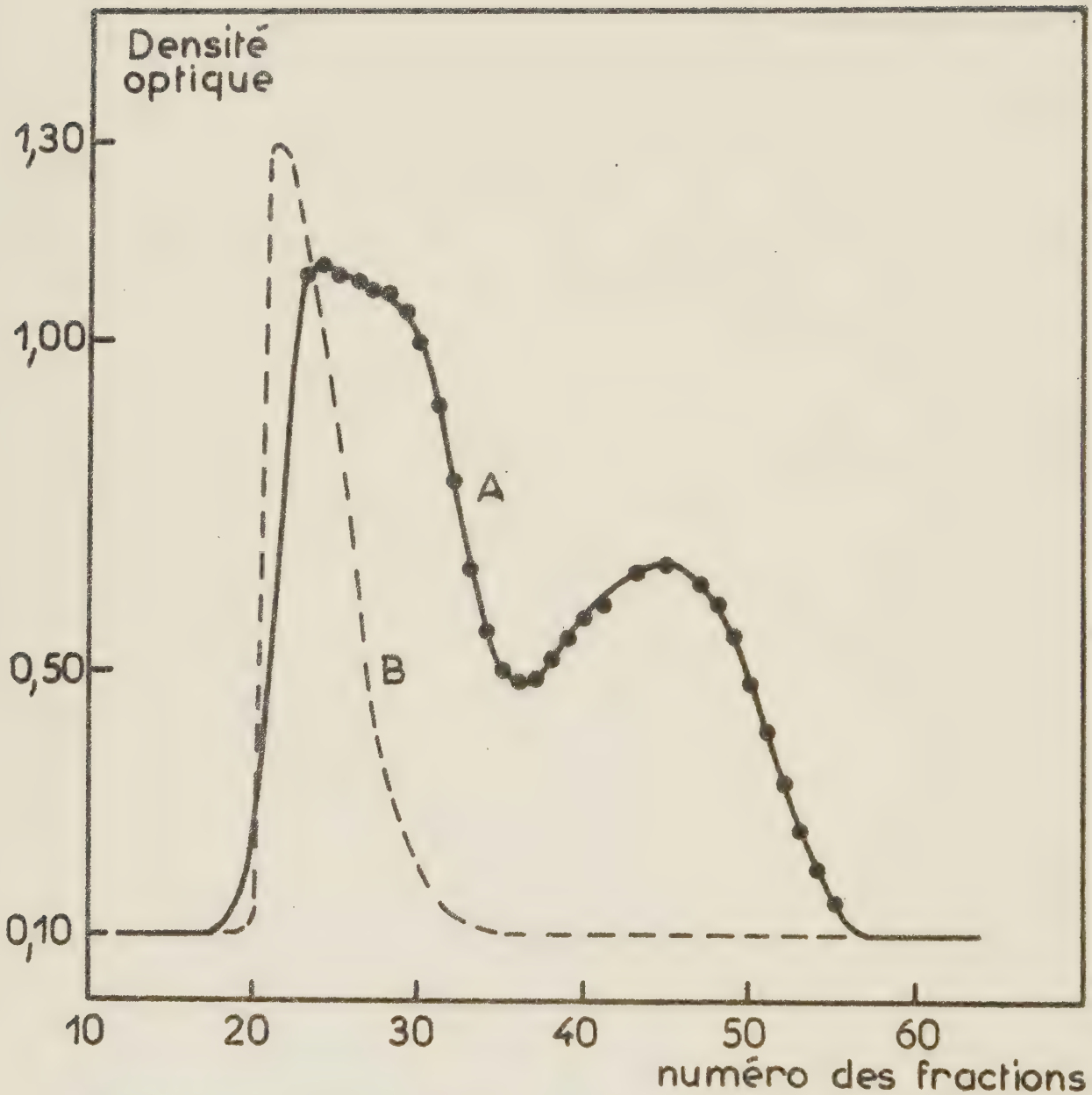


Fig. 15: Comparaison de 2 courbes de fractionnement sur Sephadex G 200
courbe A: solution à p_H 4,3
courbe B: même solution à p_H 4,4 1mois après

Introduction

Il y a deux méthodes pour obtenir une solution contenant seulement des agrégats :

- soit fractionner sur une colonne de gel une solution partiellement agrégée et travailler sur des fractions provenant du pic des agrégats
- soit préparer une solution et laisser précipiter les molécules libres ; au bout d'un temps plus ou moins long, il reste seulement des agrégats en solution. Nous avons découvert incidemment cette méthode;si on se reporte à la figure 15, on voit que nous avons chromatographié à plus d'un mois d'intervalle la même solution dans des conditions de pH légèrement différentes sur deux colonnes de gel Sephadex G 200 non identiques; malgré la différence d'aspect des deux chromatographies, il apparaît que la solution ayant un mois de plus d'"âge" ne contient plus de molécules libres.

Sur ces solutions contenant uniquement des agrégats, nous étudions d'abord à l'aide de la sédimentation le phénomène de désagrégation en fonction de la concentration et de la température. Ensuite, nous présentons des études du pouvoir optique rotatoire en fonction de la température et de la dispersion optique rotatoire à 23°C avant et après désagrégation. Enfin, nous abordons le problème de la réagrégation des molécules dans ces solutions après traitement thermique.

I. Analyse par sédimentation

A. Influence de la concentration

Notre solution initiale contient que des agrégats (après précipitation) et nous effectuons trois dilutions ; nous

avons fait mesurer les constantes de sédimentation S de ces 4 solutions

	concentration	nombre de pics de sédimentation	$S_{20} \cdot 10^{13}$
310 B	0,64 %	1	6,5
3/10	0,19 %	1	7,9
2/10	0,13 %	1	7,9
1/10	0,06 %	1	7,7

Même dix fois diluée la solution contient toujours 100 % d'agrégats, ce qui veut dire que la dilution n'entraîne pas la formation de molécules libres et ne signifie cependant pas qu'il n'y ait pas eu fragmentation pour certains agrégats.

La valeur de 1/S décroît avec la concentration, puis atteint un palier pour les plus faibles concentrations. Le fait que la variation de 1/S avec la concentration ne suive pas la loi : $\frac{1}{S} = \frac{1}{S_o} + k\ c$, comme le trouvait SCHUSTER[2] avec des solutions particllement agrégées, ne nous apporte aucun renseignement supplémentaire.

B. Influence de la température

Nous utilisons une solution de l'échantillon CRM 310 contenant uniquement des molécules agrégées (après précipitation) de concentration 0,2 % et à pH 4,35. Nous avons fait sédimenter à différentes températures cette solution ; les résultats sont reproduits dans le tableau suivant :

Température	nombre de pics	$S_{20}.10^{13}$
22,8°C	1	6,9
32,4°C	1	7,3
36,4°C	1	6,9
39,2°C	2	6,4 1,9
22,9°C (après avoir été chauffé à 39,2°C)	2	6,6 2,7

Cette expérience nous indique que la désagrégation commence au-dessus de 37°C. Nous pouvons la comparer aux expériences de chromatographie sur gel en fonction de la température, décrites dans la cinquième partie et reportées sur la figure 24, puisqu'elles ont été effectuées avec une solution du même échantillon CRM 310 à pH 4,4 et à la concentration de 0,25 % ; dans ce cas, la désagrégation est déjà commencé à 37°C. Notons que la solution utilisée pour l'expérience de sédimentation a bien une concentration de l'ordre de 0,2 % (après précipitation), mais sa concentration initiale était 2,5 % ; nous pensons qu'il y a eu fractionnement par cette précipitation et donc que le soluté est moins polydisperse. Ceci nous semble expliquer le fait que la température de commencement de désagrégation est plus élevée. Nous observerons les mêmes écarts dans les résultats de manipulations de pouvoir optique rotatoire qui font l'objet du paragraphe suivant.

II. Expériences de pouvoir et de dispersion optiques rotatoires

Ces expériences ont été faites sur les solutions utilisées en sédimentation et décrites dans le paragraphe II D de la cinquième partie.

A. Cycles d'hystérésis

On distingue l'hytérésis de la simple métastabilité par le fait que cette dernière ne donne pas naissance à des processus cycliques reproductibles ; de plus, les systèmes métastables ne présentent pas de courbes de pénétration dans les cycles.

EVERETT[44] attribue l'hystérésis à l'existence d'un grand nombre de domaines indépendants, dont quelques uns au moins sont métastables. Le terme de domaine est utilisé dans le sens de groupes d'éléments (c. à d. de molécules ou de groupes de molécules) qui peuvent exister sous au moins deux états métastables pour une même valeur d'une variable externe contrôlant le système. Les variables externes usuelles ne suffisent plus à définir l'état d'un système et on doit introduire au moins une variable interne, dont la valeur dépend de l'histoire du système.

Les caractéristiques suivantes du système du PALG concordent avec le modèle théorique dû à EVERETT. Reportons nous à la figure 1 : pour le PALG, la partie du cycle d'hytérésis dépend du temps et est irréversible ; elle représente la disparition d'un état métastable du polypeptide. Une partie (M ↔ C) de la boucle réversible représente la transition hélice-chaîne du polymère non agrégée : l'autre branche (A → M) irréversible ne dépend pas du temps.

En accord avec la théorie, tout point à l'intérieur d'un cycle d'hytérésis peut être atteint par un nombre infini de chemins. Une valeur donnée de [α] ne caractérise pas le PALG à faible pH puisque le système peut atteindre cette valeur de

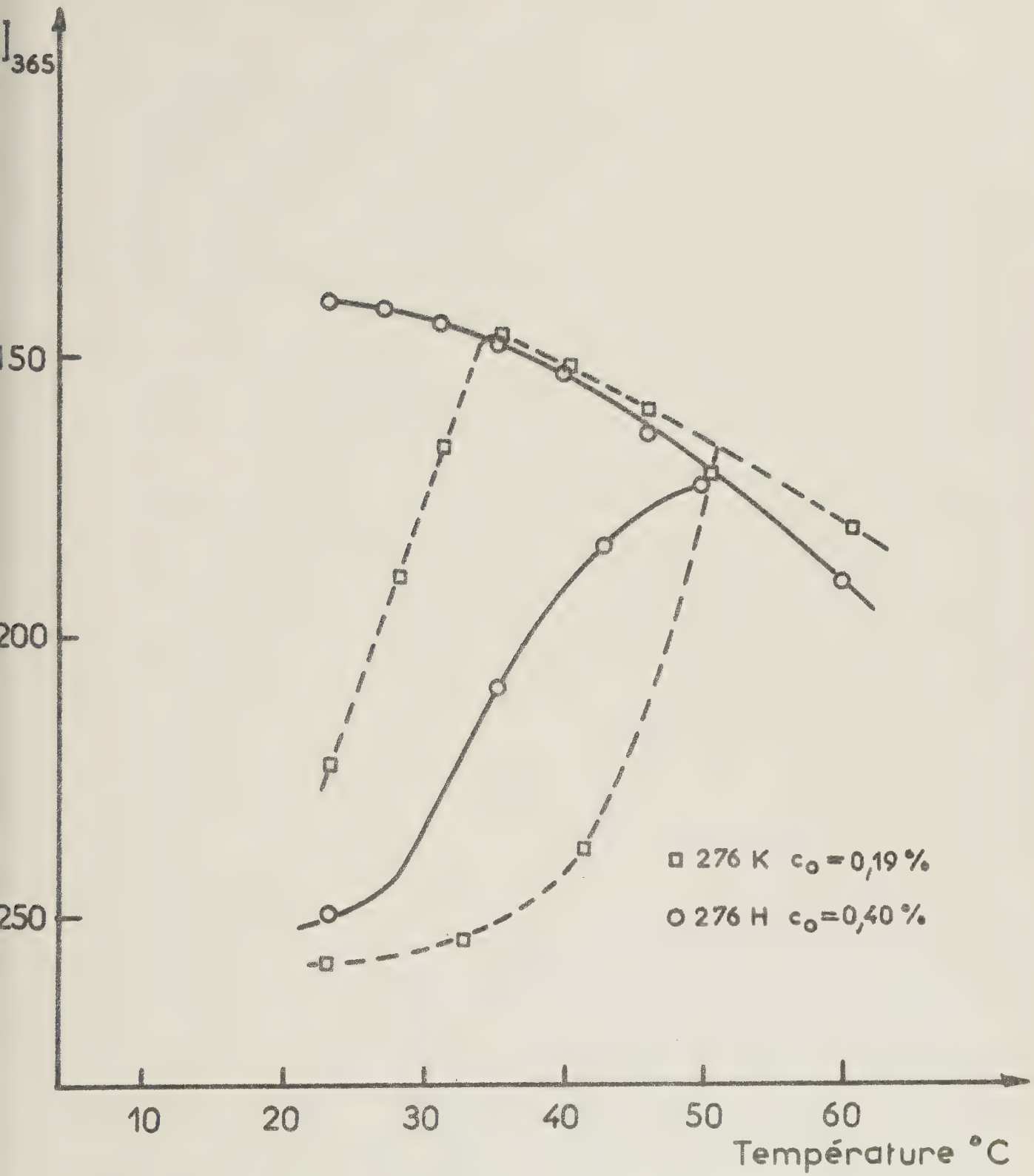

I365
150
200
250
10
20
30
40
50
60
Température °C
□ 276 K c0 = 0,19 %
○ 276 H c0 = 0,40 %

Fig. 16

nombreuses manières. C'est cette approche qui détermine la voie dans laquelle va évoluer le système après cette valeur. Nous avons voulu voir s'il existe une différence entre les courbes de chromatographie sur gel de deux solutions (partiellement agrégées) identiques au départ et présentant la même valeur de la rotation spécifique pour une température donnée, mais ayant atteint cette valeur par deux variations thermiques distinctes ; la différence entre les deux courbes représentatives des chromatographies est si minime que, vu la précision des mesures, elle n'est pas significative et nous ne pouvons rien conclure.

On peut faire l'hypothèse que chaque domaine, dont il est question dans la théorie d'EVERETT, est formé d'un agrégat de molécules hélicoïdales de PALG de même masse moléculaire. A l'aide de différentes observations, SCHUSTER, JENNINGS et SPACH [2] en déduisant que le comportement en forme de cycle d'hystérésis doit être dû à une distribution de propriétés dépendantes de la température et liées à la distribution de masses moléculaires. Il s'en suit qu'avec un échantillon parfaitement monodisperse on ne devrait pas observer une vraie hystérésis, mais simplement une métastabilité. Nous avons un résultat de manipulation qui va dans ce sens. Sur la figure 16, nous avons tracé les cycles d'hystérésis pour les solutions 276 H et 276 K ne contenant que des molécules agrégées à pH 4,1 et qui ne diffèrent que par leur concentration après précipitation : 0,40 % pour 276 H et 0,19 % pour 276 K ; nous voyons que, pour la solution la moins concentrée le cycle se forme presque complètement à une température supérieure à 23°C alors que c'est loin d'être le cas pour l'autre solution. Nous pensons que, puisque la précipitation revient à un fractionnement, la solution la plus diluée contient un soluté dont la polydispersité est inférieure à celle du soluté dans l'autre solution. Le soluté le moins polydisperse commence donc

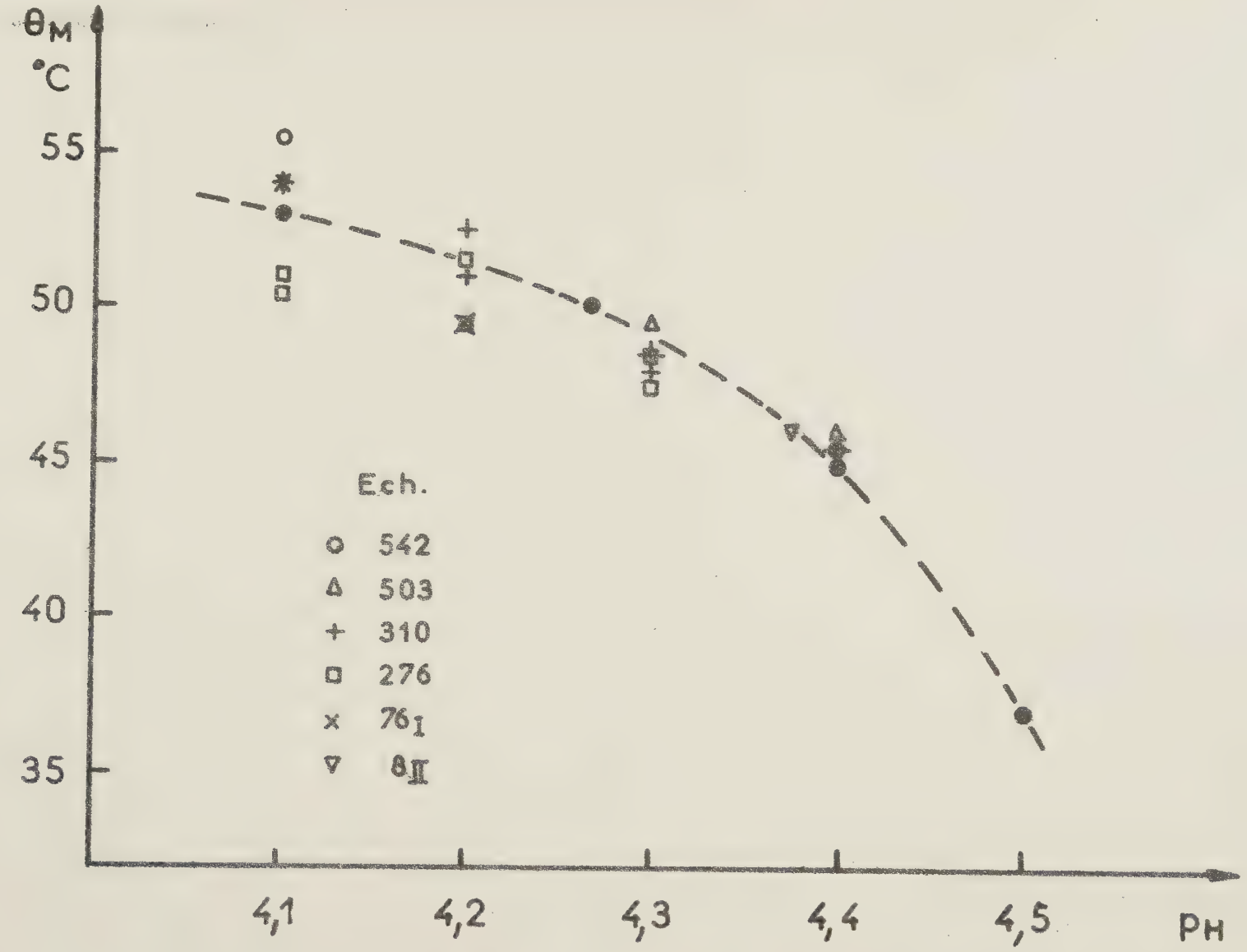


Fig. 17 - Variation de la température de disparition complète des agrégats avec le pH . Comparaison avec les résultats de JENNINGS (--,--)

à se réagréger à une température supérieure à celle du soluté le plus polydisperse. Pour un échantillon parfaitement monodisperse, le cycle devrait disparaitre et l'agrégation commencer à la température du point M. Nous retrouvons ainsi le même phénomène que dans le paragraphe I B : la désagrégation commence à la température la plus élevée, pour le soluté le moins polydisperse.

B. Température de disparition complète des agrégats

On peut déterminer pour chaque cycle d'hytérésis tracé la température au-dessus de laquelle il n'y a plus d'agrégats en solution. Nous avons reporté nos résultats sur la figure 17 en fonction du pH et les avons comparé à ceux de JENNINGS[2]. Nos valeurs sont moins précises que celles de JENNINGS puisque nous n'avons pas procédé à leur recherche systématique en mesurant la rotation spécifique degré par degré au voisinage du point M. Le domaine d'incertitude de nos valeurs augmente sensiblement quand le pH diminue. Néanmoins, nos domaines contiennent les valeurs de l'auteur désigné ci-dessus.

C. Amplitudes des cycles d'hytérésis

Nous avons reporté sur la figure 18 les valeurs en fonction du pH, de la différence entre la rotation spécifique de la solution contenant 100 % de molécules agrégées et celle de la solution ne contenant plus que des molécules libres, et ce pour la longueur d'onde 365 nm à 23°C. L'imprécision des mesures entraîne une incertitude de ± 5°, à laquelle il faut ajouter l'erreur due à l'extrapolation de la valeur de $[\alpha]^{23}_{365}$ après désagrégation complète pour les pH 4,1, 4,2 et 4,3, puisqu'il y a réagrégation avant 23°C. D'après la figure, il y aurait un léger accroissement de la valeur de $\Delta[\alpha]_{365}$ quand le pH diminue et nous

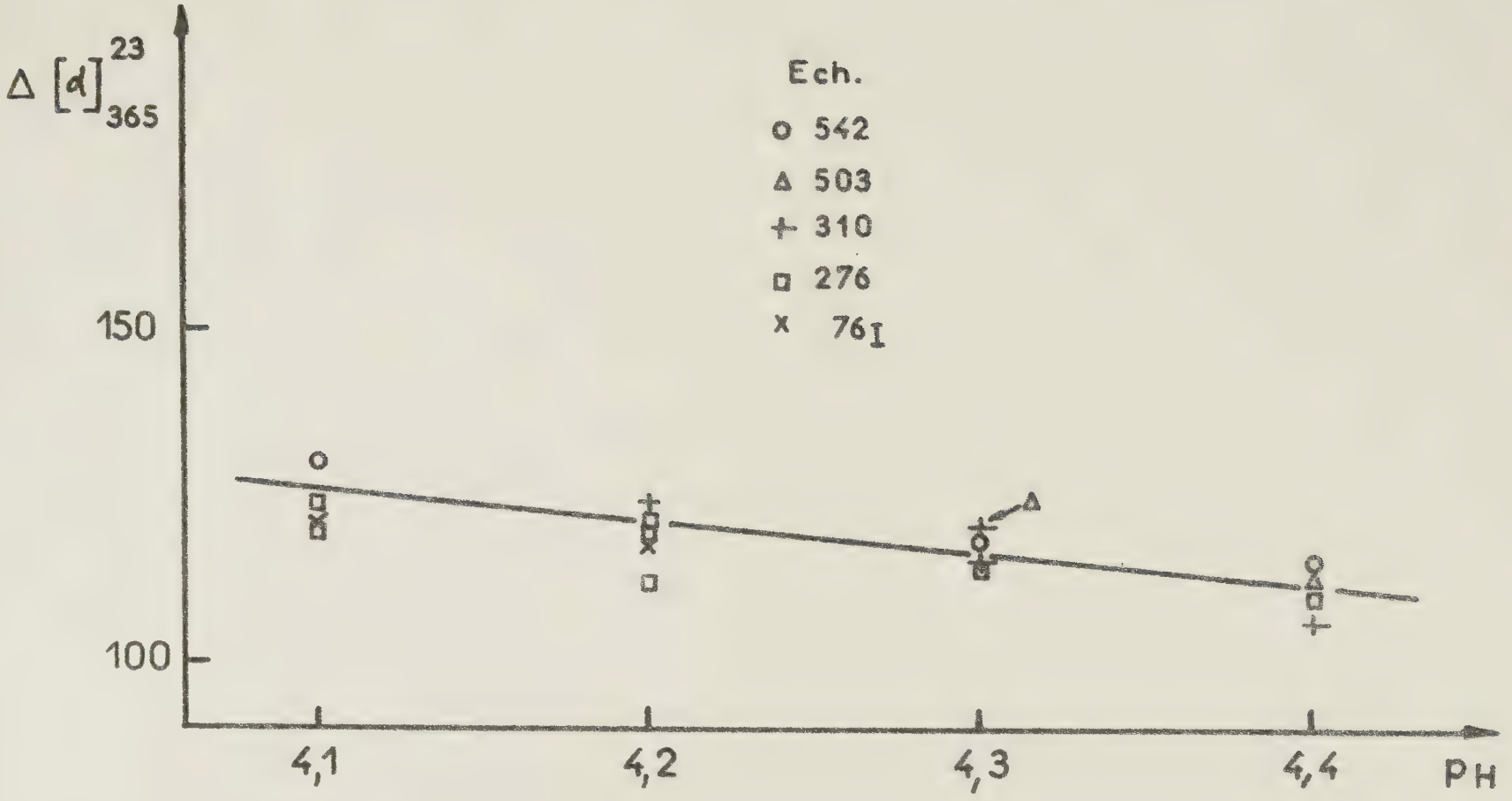


Fig. 18

donnons les valeurs suivantes sans conclure formellement :

pH = 4,4	$\Delta [\alpha]^{23}_{365}$ = 110 ± 5)°
4,3	115 ± 5)°
4,2	120 ± 5)°
4,1	125 ± 5)°

Ce léger accroissement peut être lié ou non à la température du point M qui croît dans le même sens.

A titre de comparaison, nous pouvons rappeler que JENNINGS extrapolait en gros divers résultats et donnait comme valeur maximale de $\Delta [\alpha]_{365}$ mais à la température de 5°C, 150°.

Les valeurs de $\Delta [\alpha]^{23}_{365}$ peuvent servir à vérifier si le taux d'agrégation est égal à 100 % pour des solutions de même force ionique. Nous n'avons pas de résultats qui nous prouvent que les valeurs de $\Delta [\alpha]_{\lambda}$ varient linéairement avec le pourcentage de molécules agrégees, aussi nous ne pouvons pas déterminer le taux d'agrégation d'une solution à l'aide de la valeur de l'amplitude du cycle d'hystérésis.

Comme le deuxième coefficient de l'équation de MOFFITT b_o garde la même valeur avant et après désagrégation(aux erreurs expérimentales près), le premier coefficient a_o de cette même équation suit les variations de Δa_{λ}, donc de $\Delta [\alpha]_{\lambda}$:

$$\Delta a_o = 2{,}0 . \Delta [\alpha]_{365}$$

et nous trouvons pour le passage de 0 à 100 % d'agrégats :

$$\Delta a_o = \begin{cases} - 220 \text{ (pH 4,4)} \\ - 250 \text{ (pH 4,1)} \end{cases}$$

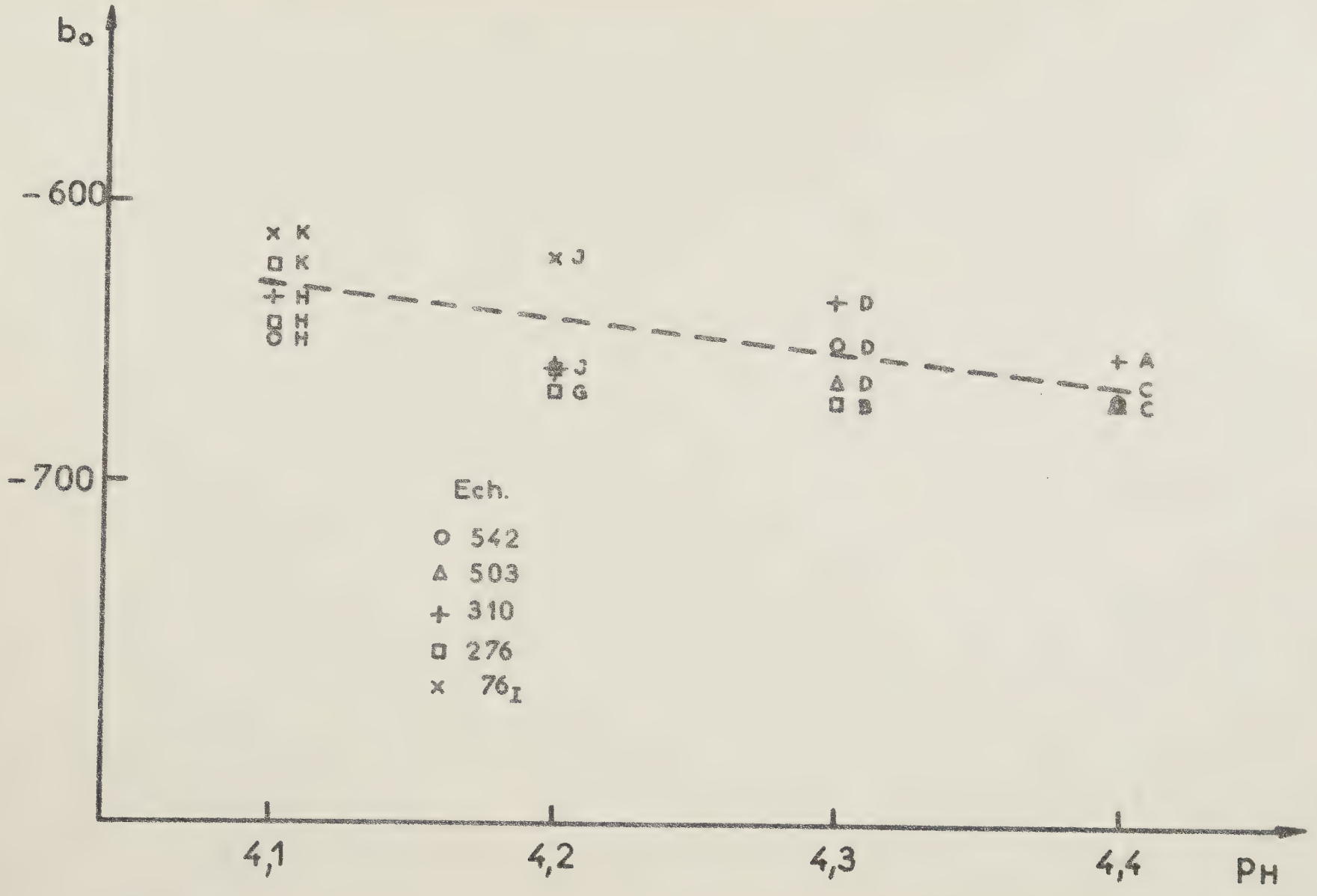


Fig. 19

Ce changement de la valeur du coefficient a_o lors de l'agrégation prouve qu'il y a un changement important dans l'environnement des atomes de carbone asymétrique du résidu acide glutamique. SCHUSTER[1] a suggéré, d'après des expériences sur l'acide N-acétyl-L-glutamique dans les solvants de diverses constante diélectriques[45], que la variation de a_o indique un accroissement de la constante diélectrique locale.

D. Deuxième coefficient de l'équation de MOFFITT

Sur la figure19, nous avons reporté les différentes valeurs de b_o données à ± 15° en fonction du pH ; elles se rassemblent dans l'intervalle : $b_o = (-640 \pm 30)°$; signalons que, dans certains cas, les points représentatifs de $(m[\lambda])(\lambda^2 - \lambda_o^2)$ en fonction de $(\lambda^2 - \lambda_o^2)^{-1}$ ne s'alignent pas très bien. Nous pouvons constater qu'il y a diminution de la valeur de b_o lorsque le pH diminue (courbe en pointillés) ; la valeur moyenne de b_o passe de - 665° (pH 4,4) à - 630° - (pH 4,1), ce qui correspondrait à une décroissance de 115° par unité de pH.

CASSIM et TAYLOR[9] ont observé le même phénomène en fonction du pH pour le PALG : dans un milieu de faible force ionique, à 20°C, la valeur de b_o est - 650° à pH 4,4 et - 565° à pH 2,5 ; ce dernier chiffre est obtenu par extrapolation de résultats recueillis sur des solutions partiellement aqueuses de PALG, où il y a decroissance de la valeur de b_o de 35° par unité pH jusqu'à un palier atteint pour pH 2,5.

Par contre, TOMIMATSU[46] ne constate pas de variation avec le pH ; entre pH 4,19 et 4,53, b_o garde la valeur - 670°. De plus, b_o ne varie pas quand la masse initiale de l'échantillon varie ; par exemple, pour deux échantillons différents et dans le même domaine de pH, b_o a la valeur : - 672° ± 12°.

Pourtant certains résultats de JENNINGS et collaborateurs[2] allaient dans le sens d'une variation de b_o avec la masse moléculaire de l'échantillon :

(à 5°C, en solution 0,1 M CH_3COOH-KCl)

b_o	M_w
- 520°	23.600
- 605°	65.000
- 636°	84.000

Rappelons à ce sujet que nous avons des résultats en accord avec ceux des derniers auteurs cités (voir 3ème partie, paragraphe I D).

D'après SCHECHTER[47], la valeur de b_o pour la forme 100 % hélicoïdale serait - 700° et + 100 pour 0 % (en prenant λ_o = 212 nm comme les autres auteurs et nous-mêmes) ; cette valeur est observées à 2°C par CASSIM et TAYLOR[9] ; de plus, il semble que la valeur de - b_o décroît quand la force ionique croît : par exemple, FASMAN[48] trouve à 20°C pour le même pH :

b_o = - 625° dans H_2O et ~~b_o = - 460° en solution~~

b_o = - 460° en solution 0,2 M NaCl

Ceci nous amène à conclure que la valeur (- 700°) pour le b_o d'une solution 100 % hélicoïdale et en l'absence de sels parait fort plausible.

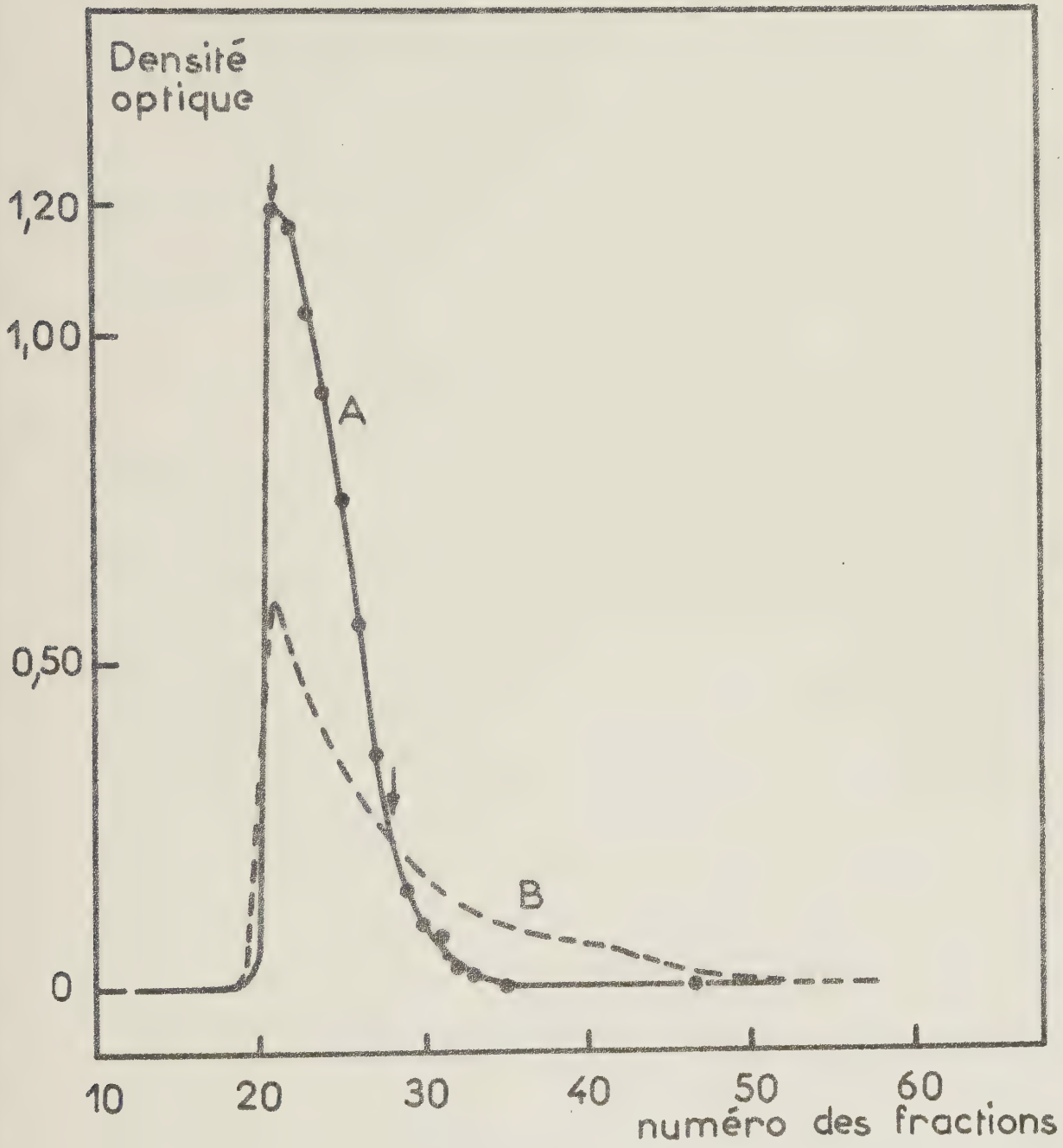

Densité
optique
1,20
1,00
0,50
0
A
B
10
20
30
40
50
60
numéro des fractions

Fig. 20

III. Problèmes de réagrégation

Nous cherchons à déterminer si dans une solution ou dans une fraction où toutes les molécules étaient agrégées puis complètement désagrégés on peut retrouver un taux d'agrégation de 100 %. Pour atteindre ce but, nous avons employé deux méthodes : la chromatographie sur gel et l'ultracentrifugation.

A. Analyse par chromatographie

La courbe A de la figure 20 représente la chromatographie d'une solution au sortir d'une colonne de Sephadex G 200 et à pH 4,4. Les fractions 21 à 28 ont été dialysées contre de l'eau distillée, puis lyophilisées ; en effet, on ne peut pas refaire passer les fractions telles quelles sur la colonne, après seulement un chauffage et un refroidissement, car elles sont trop diluées. Le produit de la lyophilisation est remis en solution à une concentration inférieure à celle de la solution chargée sur la colonne et à pH 4,4, puis chargé après passage en chambre froide à 4°C sur la même colonne de gel. Le résultat est reporté sur la courbe B, dont l'allure est conforme à ce que nous attendions : pic des agrégats, puis décroissance plus lente vers la ligne de base.

Cette expérience n'est pas concluante pour deux raisons principalement ; d'une part, nous ne sommes pas absolument sûrs que les fractions utilisées contiennent que des molécules agrégées ; d'autre part, la concentration de la solution donnant la courbe B est inférieure à celle de la solution où il n'y a que des agrégats, et la vitesse de formation des agrégats dépend de la concentration.

Ces inconvenients nous ont conduit à penser à faire une expérience beaucoup plus simple sur une seule fraction par ultracentrifugation.

B. Analyse par ultracentrifugation

Nous avons choisi l'une des premières fractions obtenue par chromatographie sur gel à partir d'une solution contenant des agrégats, cette fraction a une concentration de l'ordre de 0,1 %. Une première manipulation pour déterminer la constante de sédimentation donne un seul pic rapide. Nous chauffons vers 50°C pendant 1/2 heure, laissons refroidir à température ambiante et refaisons la même manipulation : le cliché de sedimentation décèle un seul pic lent. La solution est ensuite laissée deux semaines en chambre froide ; nous sédimentons à nouveau : il y a deux pics, un lent et un rapide.

La conclusion pour cette manipulation est que la réagrégation ne se fait pas totalement, mais ceci n'est pas une conclusion absolu, car la concentration est faible et la réagrégation ne peut être totale sans doute pour cette seule raison.

La même manipulation faite avec une solution contenant 100 % de molécules agrégées (après précipitation) et de concentration plus élevée (c = 0,19 %) prouve que la réagrégation est totale au bout de trois semaines dans ce cas ; mais la comparaison des clichés de sédimentation où il n'y a que le pic rapide montre une certaine différence dans la vitesse de diffusion sans doute due aux tailles non identiques des agrégats dans les deux cas.

Cinquième Partie

ETUDE DU MECANISME D'AGREGATION

Introduction

Dans cette cinquième partie, nous rendons compte des résultats relatifs au phénomène d'agrégation. Notre principal problème est la détermination du nombre moyen $\bar{n}$ de molécules par agrégat. Il est intéressant de connaître $\bar{n}$ pour donner une première idée sur la structure des agrégats. Les résultats de JENNINGS, SCHUSTER et SPACH[2] ont montré que le pourcentage de molécules agrégées augmente quand le pH diminue, ce qui peut être dû soit à un accroissement du nombre $\bar{n}$, soit à l'apparition de nouveaux agrégats ($\bar{n}$ constant). Dans ce but, nous avons utilisé trois méthodes, dont deux reposent sur des fractionnements; l'autre méthode est celle employée par JENNINGS et SCHUSTER ; or, pour cette dernière, nous devons connaître le pourcentage de molécules agrégées en solution. Ceci nous a conduit à étudier les variations de ce pourcentage en fonction du pH et de la masse moléculaire moyenne du polymère brut. Ensuite, nous décrivons les méthodes employées pour la détermination du nombre $\bar{n}$ et leurs résultats respectifs.

I. Variations du pourcentage de molécules agrégées avec le pH et la masse moyenne

A. Techniques expérimentales

Pour atteindre le taux d'agrégation d'une solution de PALG, nous avons utilisé le cas échéant deux méthodes :

a) l'ultracentrifugation en optique réfractométrique. Le résultat donné par l'appareil sous forme de cliché est une courbe $dc/dx = f(x)$, x étant la distance d'un point de la cellule

à l'axe du rotor et c la concentration du soluté en ce point. Dans le cas d'une solution de PALG contenant à la fois des molécules isolées et des agrégats, la courbe $dc/dx = f(x)$ est formée de deux pics, les aires délimitées par les courbes de gradient de concentration ne sont pas exactement proportionnelles aux concentrations des deux composants à cause de l'effet JOHNSTON-OGSTON[49] qui est le fait que la concentration du composant le plus lent (alors qu'elle devrait être constante) change à la limite du composant plus rapide, la présence de ce dernier ralentissant la sédimentation du premier ; il faut faire sur les aires une correction décrite par SCHACHMAN et collaborateurs[50].

b) la séparation chromatographique sur gel de dextrane. Elle a été décrite dans la deuxième partie.

Pour comparer ces deux techniques, nous avons opéré à la concentration de 0,5 % imposée par la chromatographie sur gel : nous voulionsobtenir pour les différentes fractions des valeurs de densités optiques qui soient inférieures à l'unité afin d'avoir la meilleures précision possible. Par contre, cette concentration ne donne pas une très grande précision sur la mesure des aires en ultracentrifugation surtout lorsque les clichés montrent la présence de deux pics. L'avantage le plus appréciable de l'ultracentrifugation est sa rapidité : 3 heures au lieu de 24 à 48 heures pour la chromatographie sur gel selon le type de Sephadex (G 100 ou G 200) employé. La précision des deux techniques de mesures est du même ordre de grandeur ; elles donnent les pourcentages des deux espèces en présence, à 10 % près, mais les expériences de chromatographie sur gel sont moins reproductibles que celles d'ultracentrifugation.

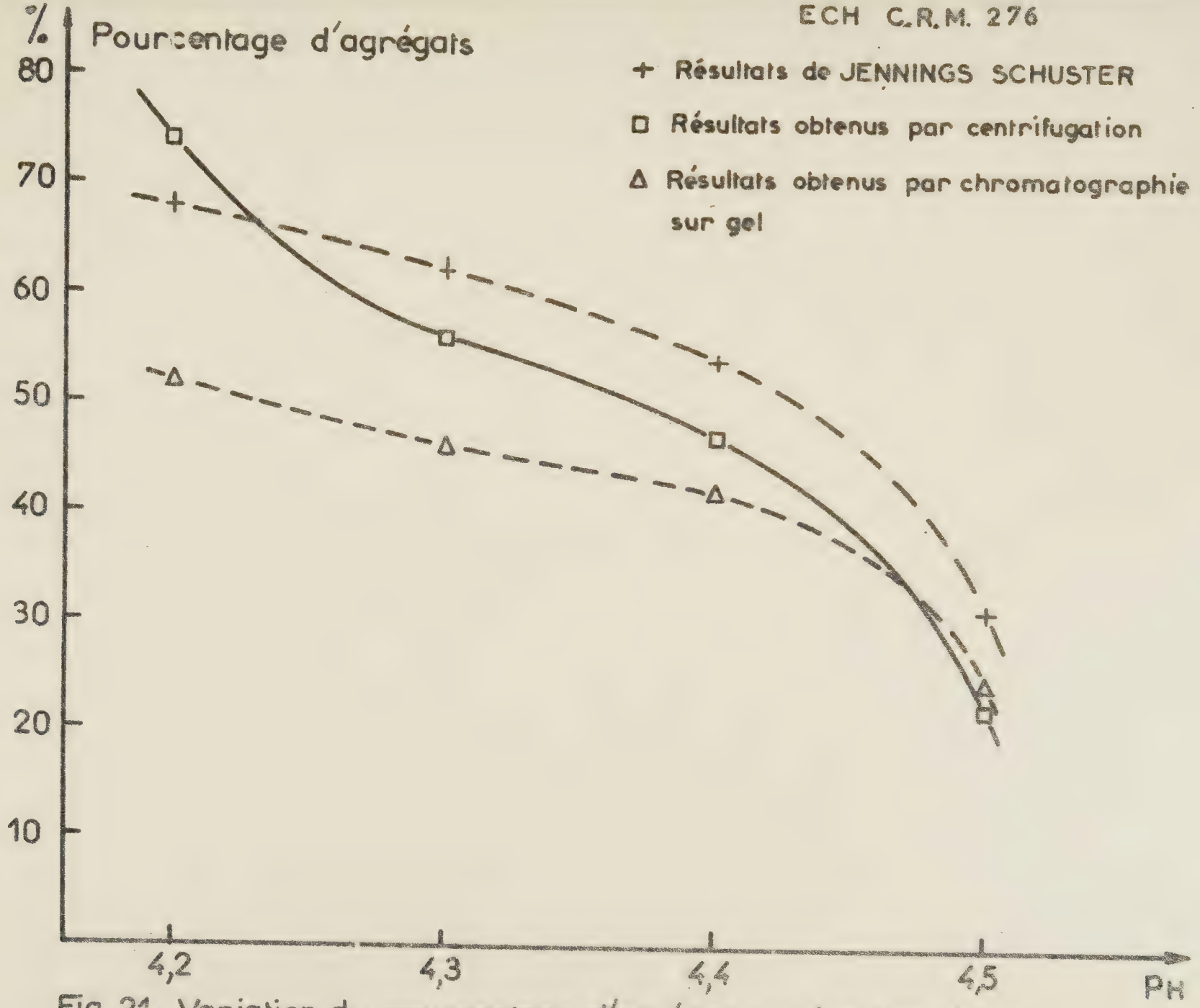


Fig. 21: Variation du pourcentage d'agrégats en fonction du pH

B. Variation avec le pH

Nous avons utilisé les deux méthodes en opérant sur une même solution (Ech. CRM 276) et au même temps puisque certain solutions commencent à précipiter au bout de quelques heures. Nous avons fait la même experience pour quatre pH différents à 22°C : 4,5 - 4,4 - 4,3 - 4,2. Les solutions, une fois préparées, sont laissées à 4°C plusieurs heures.

Les résultats rassemblés dans le tableau VI sont reprotés sur la figure 21 ; nous y avons ajouté ceux de JENNINGS-SCHUSTER obtenus par ultracentrifugation. On voit que d'une façon générale le pourcentage d'agrégats augmente quand le pH diminue. Cette variation est liée à celle du pourcentage d'ionisation.

L'examen de la figure 21 montre des divergences entre les différents auteurs pour une même technique utilisée ; elles sont en partie explicables par le choix des tampons de référence En effet, dans le système de référence (Merck pH = 4,0 - pH = 5,0 $\pm$ 0,02) nous avons mesuré le pH de notre tampon qui est égal à 4,41 et dans le système de référence Radiometer (pH = 6,5 $\pm$ 0,02), l'indication de pH est 4,48. Cette différence de $\pm$ 0,07 unité pH semble suffisante pour expliquer l'écart entre les deux courbes tracées à partir des résultats des expériences d'ultra-centrifugation (à l'exception de la valeur à pH 4,2).

Les résultats de chromatographie sur gel sont systématiquement inférieurs à ceux d'ultracentrifugation ; cette différence s'explique difficilement puisque, sauf pour le pH 4,4, une même solution a été utilisée pour les deux techniques à chaque pH. Il se peut que les impuretés des gels employés dans les colonnes sortent en fin de chromatographie, donc avec les molécules isolées, faussent le pourcentage de molécules agrégées.

Tableau VI

Taux d'agrégation en fonction du pH
Ech. CRM 276

Tampon 0,1 M CH_3COOH - KCl

pH		4,5	4,4	4,3	4,2
Ultracentrifugation c = 0,5 %	Pourcentage d'agrégats	22	47	56	74
	$S.10^{+13}$	5,0	4,6	5,3	5,7
	Pourcentage de molécules isolées	78	53	44	26
	$S.10^{+13}$	1,4	1,5	1,5	1,5
chromatographie sur Sephadex c = 0,5 %	Pourcentage d'agrégats	(G_{100}) 24	(G_{200}) (C = 0,25 %) 42	(G_{200}) 46,5	(G_{100}) 52
	Pourcentage de molécules isolées	76	58	53,5	48
Ultracentrifugation C = 0,4 % SCHUSTER-JENNINGS	agrégats	31	54	62	68
	molécules isolées	69	46	38	32

Variations des constantes de sédimentation

On constate en examinant le tableau VI que la valeur de la constante de sédimentation des molécules agrégées diminue puis augmente quand le pH décroît de façon monotone et qu'elle reste sensiblement constante pour les molécules isolées.

Il y a en fait deux facteurs qui influent sur la vitesse de sédimentation des molécules agrégées : leur concentration, et leur masse moyenne, que le nombre moyen $\bar{n}$ de molécules par agrégat soit constant ou variable ; si la concentration augmente, la valeur de S diminue ; si le nombre $\bar{n}$ est constant et comme ce sont des molécules de masses de plus en plus faibles qui s'agrègent, la masse moyenne des agrégats diminue, ce qui entraîne une diminution de la valeur de S ; par contre, si $\bar{n}$ n'est pas constant, la valeur de S augmente. Entre 4,5 et 4,4 la valeur de S augmente et le pourcentage des molécules agrégées a plus que doublé ; la concentration joue alors son rôle de ralentissement des molécules agrégées, tandis que nous ne pouvons pas nous prononcer sur le rôle de la masse moyenne. Dans la zone de pH 4,4 - 4,2, la constante de sédimentation croît ; parmi tous les facteurs que nous avons énumérés, seule l'augmentation du nombre $\bar{n}$ peut faire croître la vitesse de sédimentation et c'est donc cet effet qui l'emporte ici.

Pour les molécules libres, il y a deux groupes de facteurs d'effets opposés ; la concentration décroissante des molécules libres, ainsi que la vitesse croissante des molécules agrégées, font que la vitesse de sédimentation des premières tend à augmenter ; par ailleurs la diminution de la masse moyenne des molécules restant libre fait diminuer cette vitesse ; vraisemblablement, sous l'influence de ces deux groupes de facteurs, la constante S garde à peu près la même valeur quel que soit le pH.

Tableau VII

Taux d'agrégation de divers échantillons de PALG

C = 0,5 %, pH = 4,4, tampon 0,1 M CH_3COOH-KCl

Traitement thermique à 4°C, sédimentation à 22°C, valeurs de S ramenées à 20°C

Ech.	M_1	Pourcentage d'agrégats (f_2)	S_{ag}	Pourcentage de molécules isolées (f_1)	$S_{hel.}$
140	14.000	27	5,6	73	1,5
276	24.000	47	4,6	53	1,5
310	27.000	77	5,6	23	1,5
211	29.000	50	5,3	50	1,4
477	25.000	65	5,45	35	1,7
460	37.000	72	5,4	28	1,8

C. Variation avec la masse moyenne (pH constant)

Le tableau VII résume les conditions expérimentales et les résultats obtenus avec cinq échantillons différents. Sur la figure 22, nous avons reporté le pourcentage f_2 de molécules agrégées en fonction de la masse moyenne en poids de l'échantillon brut déterminée à partir de la viscosité intrinsèque. Il apparaît que f_2 augmente en gros avec la masse moyenne de l'échantillon, mais nos résultats ne nous permettent pas de formuler une loi précise ; à pH 4,4, des erreurs minimes sur le pH peuvent provoquer des variations assez importantes sur le pourcentage de molécules agrégées (voir figure 20) ; d'autre part, il se peut que la polydispersité joue un rôle dans ces anomalies.

Nous savions déjà que les molécules de plus forte masse avaient tendance à s'agréger ; ces résultats confirment ce fait.

II. Détermination du nombre moyen de molecules par agrégat $\bar{n}$

A. Introduction

Nous voulons déterminer le nombre moyen de molécules par agrégat et, pour cela, nous avons fait appel successivement à trois méthodes :

- celle employée par JENNINGS et SCHUSTER[2] sur des solutions partiellement agrégées ; les inconvénients de cette méthode sont que l'on opère sur des échantillons polydisperses et sur des solutions contenant à la fois des molécules libres et des agrégats.

- la méthode de fractionnement sur gel Sephadex qui nous donne des fractions plus ou moins monodisperses ; les inconvénients de cette méthode sont d'une part le faible volume

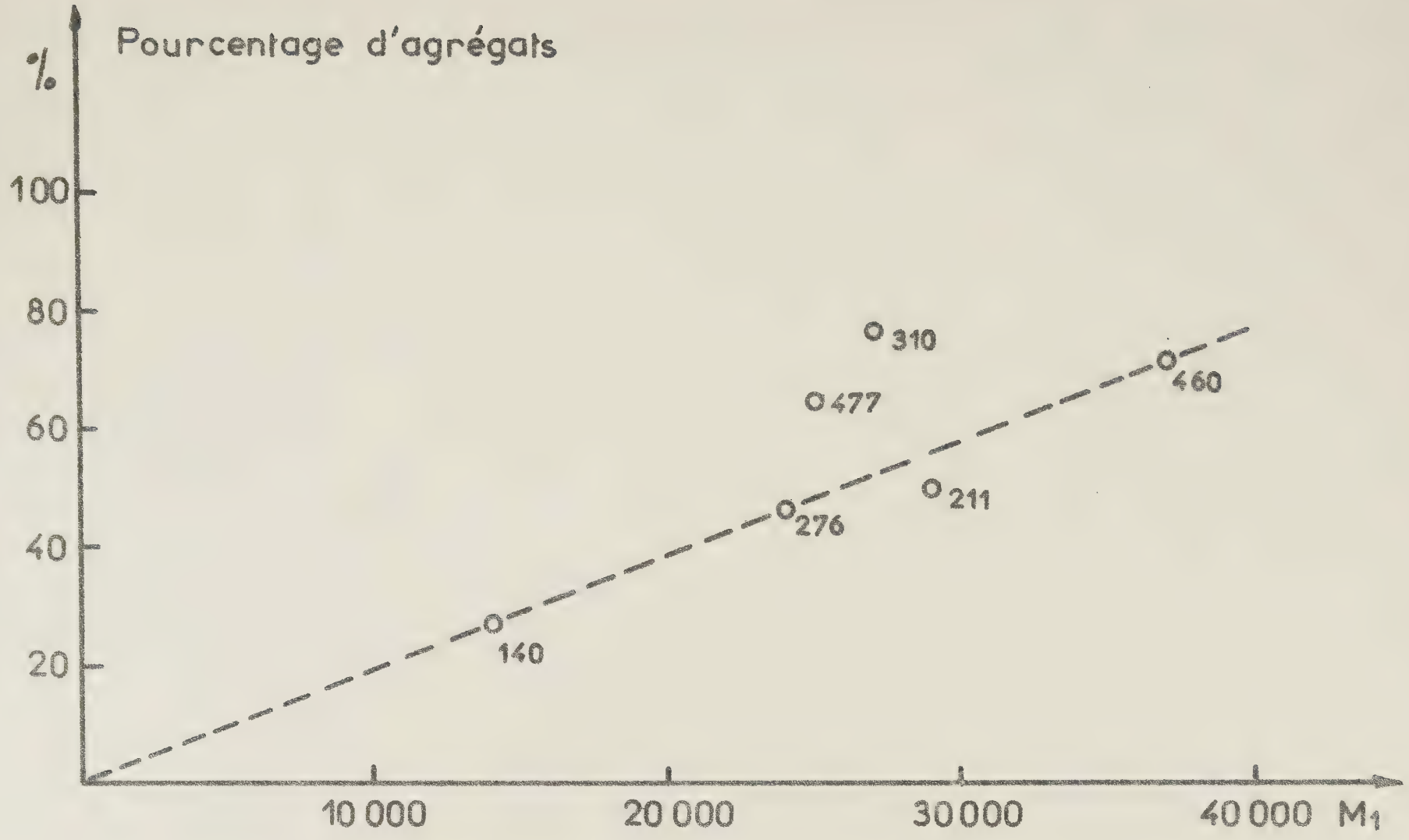


Fig. 22 : Influence de la masse moyenne de l'échantillon sur le pourcentage d'agrégats
($c = 0,5\%$ - $p_H = 4,4$ - 22°C)

de chaque fraction et d'autre part leur forte dilution.

- la méthode de fractionnement par précipitation exposée dans la troisième partie. L'avantage de cette méthode est que l'on travaille sur de grands volumes et de concentrations supérieures à 0,1 %. Comme nous le verrons par la suite, l'inconvénient de cette méthode-ci est d'être perturbée par l'hydrolyse des molécules.

B. Méthode de JENNINGS-SCHUSTER

Sur des solutions contenant à la fois des molécules libres et agrégées, il faut déterminer les pourcentages f_1 et f_2 de molécules libres et d'agrégats ; ensuite, sur les mêmes solutions on détermine par diffusion de lumière la masse moyenne M_w ; enfin après désagrégation par chauffage, une nouvelle mesure de diffusion de lumière donne la masse moyenne M_1 de l'échantillon et, quel que soit le taux d'agrégation initial ; on assimile cette valeur à celle des molécules libres, ce qui est une approximation grossière quand le taux d'agrégation est élevé. Une autre source d'incertitude dans cette méthode est le fait que l'on détermine la masse M_w à une seule concentration afin d'éviter toute variation éventuelle de f_2 et f_1 lors de la dilution. La masse moyenne du mélange des deux formes de molécules est :

$$M_w = f_1 . M_1 + f_2 . M_2$$

On a donc M_2, masse moyenne des molécules agrégées, et le nombre moyen de molécules par agrégat est : $\bar{n} = M_2/M_1$

Les mesures de diffusion de lumière doivent être faites le plus rapidement possible pour ne pas être perturbée par la formation de précipité ou de bactéries.

Dans tous les cas que nous avons étudiés, les diagrammes de ZIMM obtenus sont des courbes et non des droites ; de plus, pour certaines solutions, la masse M_1 trouvée est très différente de la masse moyenne en poids déterminée par viscosité. Pour remédier à ceci, nous avons essayé de dépoussiérer les solutions autrement que par centrifugation. La filtration simple ou double sur filtre Millipore (0,45 μ) apporte une amélioration notable, mais non totale. Nous reproduirons pour l'échantillon CRM 310 dans le tableau qui suit les difficultés de dépouillement de ces manipulations en reportant les masses obtenues par extrapolation à angle nul selon les portions de courbe utilisées :

	M_1	M_w
extrapolation avec les portions de courbe correspondant à des angles supérieurs à 90°	32.200	92.600
angles inférieurs à 90°	40.700	99.000
masse obtenue par viscosité	27.000	

Les différentes mesures ont été faites sur les solutions dont les pourcentages f_1 et f_2 sont reportées dans le tableau VII (5ème partie I, C) ; pour deux échantillons, les résultats ne sont pas trop invraisemblables et sont résumés dans le tableau qui suit :

Ech.	M_1	f_1	M_w	f_2	M_2	$\bar{n}$
310	32.200	0,23	92.600	0,77	110.000	3,4
211	23.900	0,50	46.900	0,50	72.800	3,0

(Rappel des conditions : pH = 4,4 c = 0,5 %)

Au vu de ces résultats médiocres, et considérant les quantités considérables de polymère employées pour les études de diffusion de lumière, nous avons pensé à fractionner les solutions de PALG sur des colonnes de gel comme dans la seconde partie et de déterminer sur ces fractions le nombre moyen $\bar{n}$ de molécules par agrégat.

C. Fractionnement sur gel

Notre première idée était d'étalonner une colonne de gel de dextrane en reliant le volume d'élution aux masses moléculaires déterminées par équilibre de sédimentation et de nous servir de cet étalonnage pour déterminer le nombre $\bar{n}$ en chromatographiant successivement une fraction ne contenant que des agrégats et la même après désagrégation complète. Nous avons un peu simplifié la manipulation en déterminant le nombre $\bar{n}$ sur certaines fractions sans passer par l'étalonnage de la colonne, en déterminant la masse moléculaire sur la fraction contenant 100 % d'agrégats à l'aide de la technique qui consomme la plus faible quantité de produit, en l'occurence l'équilibre de sédimentation, puis en mesurant à nouveau la masse moléculaire sur la même fraction ayant été chauffée afin d'obtenir une désagrégation complète. Le nombre $\bar{n}$ est égal au rapport de ces deux masses.

1. Choix du gel

Pour choisir le gel, nous avons utilisé l'échantillon CRM 310 à cause de son taux d'agrégation plus élevé à un pH donné que celui des autres échantillons disponibles ; nous l'avons mis en solution à pH 4,4, à la concentration de 0,5 % et nous avons divisé cette solution en deux parties :

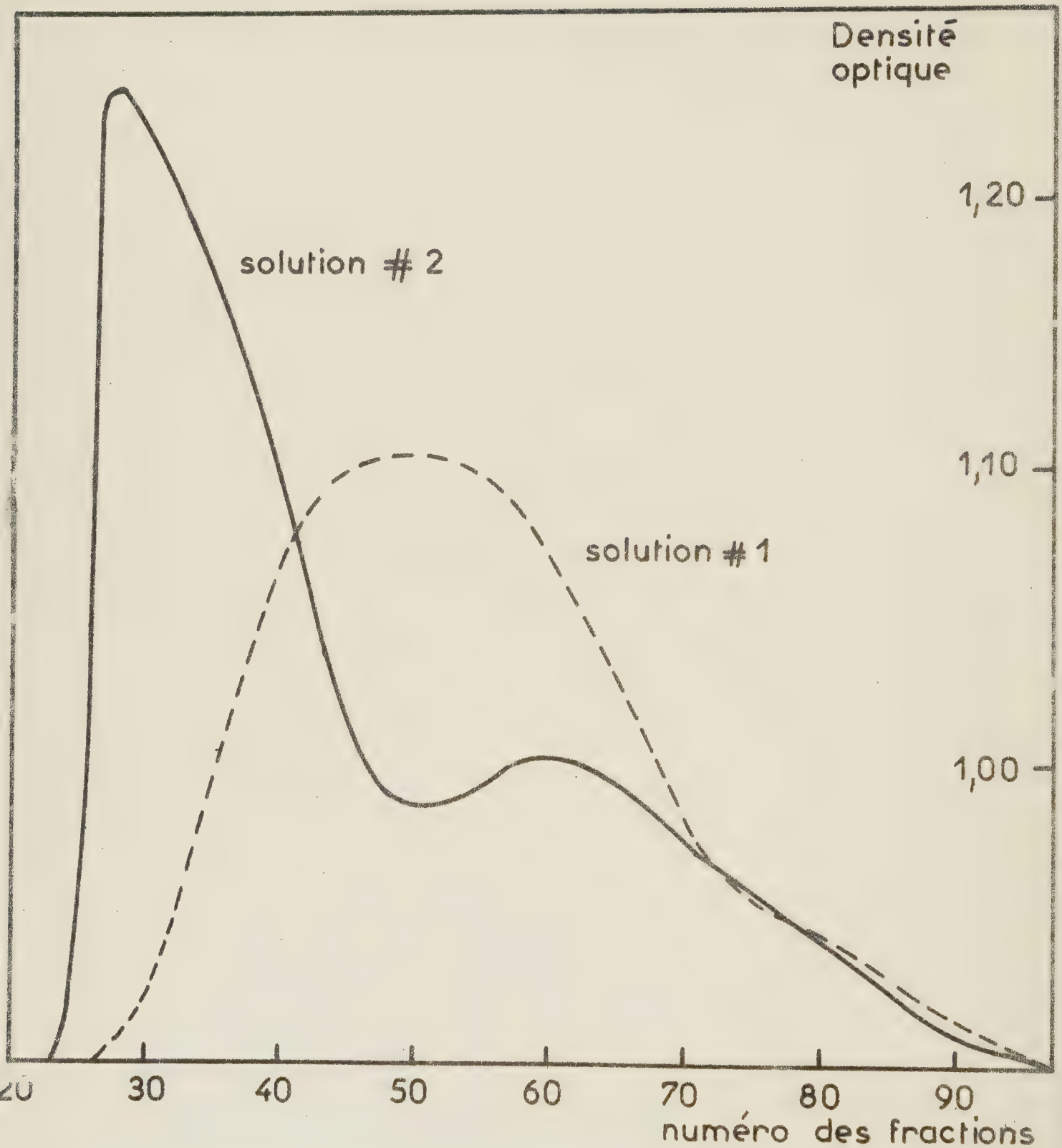


Fig. 23 : Courbes de fractionnement des solutions # 1 et # 2 sur Sephadex G 200 (Echantillon 310 0,5% $p_H = 4,4$)

- l'une est portée à 50°C 3/4 d'heure (# 1)
- l'autre est portée à 4°C pendant trois jours (# 2)

Nous avons chromatographié les deux solutions sur la même colonne de Sephadex G 200 non thermostatée ; les résultats sont reportés sur la figure 23 ; la courbe # 1 est presque symétrique ; si nous comparons la courbe 2 à une courbe analogue obtenue avec du Sephadex G 100 (Ech. CRM 276 - c = 0,25 % - pH 4,4 - figure 4), nous nous apercevons qu'il y a dans le cas présent une meilleure résolution du pic des agrégats ; remarquons cette fois encore que les deux fins de courbes sont confondues. On peut aussi remarquer, en complément au paragraphe I de cette quatrième partie, que d'après la courbe (2) nous trouvons seulement 65 % de molécules agrégées à ce pH au lieu des 77 % déterminés par sédimentation dans les mêmes conditions avec le même échantillon (tableau VII).

Avec du Bio-gel P 300 que nous avons essayé dans des conditions analogues il n'y a pas de séparation des deux pics ; notre choix s'est fixé en définitive sur le Sephadex G 200.

2. Fractionnement. Choix d'une température

Afin de faire le fractionnement à la même température que celle à laquelle l'échantillon a été préparé, nous avons thermostaté les colonnes de chromatographie. En vue de choisir une température pour les fractionnements, une solution de PALG CRM 310 à pH 4,4 et à la concentration initiale de 0,25 % a été chromatographiée sur la même colonne de gel Sephadex G 200 aux quatres températures suivantes : 4, 15, 27 et 37°C (voir figure 24) ; la courbe obtenue à 15°C, non représentée, est presque identique à celle obtenue à 4°C ; à 27°C, la désagrégation à peine entamée, est assez avancée à 37°C. Cela correspond à la partie

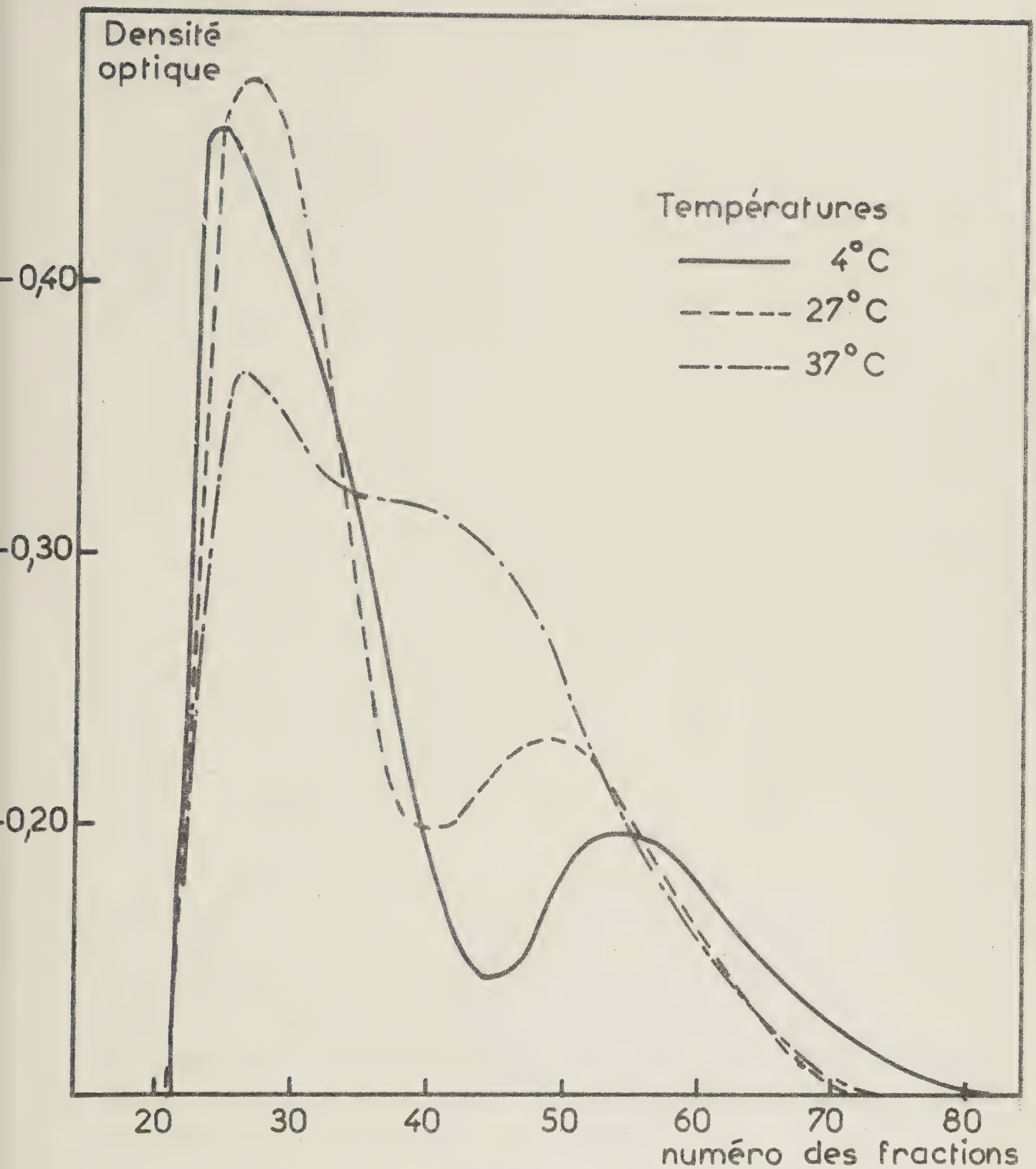


Fig. 24 : Courbes chromatographiques d'une même solution à 3 températures

(Echantillon 310, 0,25 %, p_H = 4,4 Sephadex G 200)

AM du cycle d'hystérésis (voir introduction générale). On constate donc que la désagrégation a lieu principalement à une température supérieure à 27°C ; de plus il est presque aussi intéressant d'opérer à température ambiante qu'à basse température, puisque le pourcentage de molécules agrégées est du même ordre de grandeur, et pour des raisons de commodités expérimentales.

Nous avons alimenté les colonnes avec des solutions de concentrations initiales de 2,5 %, afin d'obtenir des fractions ayant des concentrations de l'ordre de 0,1 %, mais cette forte concentration initiale diminue le pouvoir de résolution du gel.

Nous avons choisi pour les premiers essais la température de 30°C pour être à l'abri de toutes fluctuations de la température ambiante estivale. Au pH 4,45, la séparation des pics des deux espèces est très mauvaise (solution 40) ; nous savons qu'en abaissant le pH nous aurions un taux d'agrégation plus fort, ce qui pourrait améliorer la séparation des pics ; nos deux essais à pH 4,3 toujours à 30°C se soldent par deux échecs : la colonne de gel se bouche et nous pensons que cela est dû à la précipitation des solutés qui est doublement favorisée par le pH plus bas et par la température.

Un dernier essai a été effectué avec une solution ayant reposé plus d'un mois après sa préparation à température ambiante et dont une partie du soluté a précipité (solution 44) ; la chromatographie de cette solution s'opère à 25°C et donne une meilleure résolution que celle de la solution 40, puisque la concentration au moment de charger la colonne est inférieure. Nous allons maintenant rapporter les résultats obtenus avec certaines fractions de ces solutions.

3. Résultats

Avant de mettre en route l'équilibre de sédimentation, nous vérifions que la fraction utilisée ne contient que des molécules agrégées : la sédimentation à forte vitesse doit nous donner un seul pic et on calcule alors la constante de sédimentation S ; une autre manipulation nous permet de calculer la concentration c_o ainsi que le coefficient de diffusion D ; on peut comparer la masse apparente obtenue par équilibre de sédimentation (apparente puisqu'elle est déterminée à une seule concentration) à la masse calculée par la relation de SVEDBERG

$$M = \frac{S}{D} \frac{R\,T}{(I - \bar{v}\rho)} \qquad \text{avec } \bar{v} = 0{,}67 \text{ cm}^3/\text{g}$$

$$\text{et} \quad \rho = 1{,}00$$

Les résultats pour les fractions des solutions 40 et 44 sont résumés dans le tableau VIII. Les masses calculées à l'aide des valeurs de la constante de sédimentation S et du coefficient de diffusion D sont toujours inférieures aux masses correspondantes mesurées par équilibre de sédimentation. Les résultats obtenus avec la fraction 44_{25} indiquent que la désagrégation est partielle ou qu'il y a une certaine réagrégation ; les constantes de sédimentation des deux espèces sont plus faibles en présence d'un autre constituant comme le prévoit la théorie. Pour la solution 40, les masses après désagrégation des premières fractions sortant de la colonne ont des valeurs plausibles, puisqu'elles sont parmi les plus fortes masses d'un échantillon de masse moyenne globale de 27.000 ; par contre, les masses des fractions de la solution 44 ont des valeurs beaucoup trop faibles après désagrégation (pour la fraction 44_{23} non reportée dans le tableau, on trouve aussi une masse de l'ordre de 25.000) : la différence entre les deux

Tableau VIII

Résultats relatifs à certaines fractions des solutions 40 et 44 (Echantillon CRM 310, M_w = 27.000)

Fractions	40_{23}	40_{27}	44_{25}	44_{27}
pH	4,45	4,45	4,3	4,3
concentration	0,10 %	0,11 %	0,06 %	0,06 %
$S_{20}.10^{13}$	7,4	5,8	7,7	6,2
$D.10^{7}$			1,2	1,6
$M_{equil.}$	375.000	205.000	600.000	340.000
$M_{(S/D)}$			530.000	285.000
après désagrégation				
$S_{20}.10^{13}$			1,5 6,8	1,9
$D.10^{7}$			moyenne 2,1	7
$M_{equil.}$	72.500	54.000		20.500
M (S/D)			(240.000)	20.000
$\overline{n}$	5	4		

expériences est le vieillissement de la Sol.44 : la solution 40 a été chromatographiée juste après sa préparation et les fractions ont été analysées peu de temps après, tandis que la solution 44 a été laissée à température ordinaire pendant un mois et demi et les fractions ont été analysées plus d'un mois après la chromatographie.

C'est pourquoi nous avons seulement calculé le nombre moyen de molécules par agrégat pour les fractions de la solution 40 (voir tableau VIII).

4. Discussion

Il est difficile de conclure sur un seul résultat si le nombre $\bar{n}$ est ou n'est pas constante à un pH donné. Rappelons que les différents auteurs ont trouvé diverses valeurs : SCHUSTER a indiqué la valeur 4 pour un échantillon Pilot à pH 4,3, les masses étant déterminées par la méthode d'ARCHIBALD ; JENNINGS a trouvé la valeur 5,7 pour l'échantillon CRM 276 à pH 4,3, les masses étant déterminées par la méthode décrite dans le paragraphe B.

De plus l'expérience nous a montré que les quantités applicables sur les colonnes étaient trop faibles (environ 2 cm^3), ce qui ne nous permet pas d'avoir des colonnes de liquide suffisamment longues pour les expériences d'ultracentrifugation et entraîne des approximations dans les dépouillements. En outre les concentrations sont extrêmement faibles (inférieures ou de l'ordre de 0,1 %).

A cause de ces difficultés, et comme nous avons trouvé un moyen pour obtenir des solutions contenant 100 % de molécules agrégées en laissant précipiter les molécules libres au cours du temps (voir introduction de la quatrième partie), nous avons abandonné la technique de fractionnement sur gel.

D. Fractionnement par précipitation

1. Choix des paramètres

a) Le principal paramètre de notre étude étant le pH, nous avons choisi quatre pH : 4,4 - 4,3 - 4,2 - 4,1. Nous savons que par précipitation le pH des solutions augmente ; au moment où nous voulons étudier le soluté restant, nous dialysons la solution contre un tampon ayant le pH initial, ce qui perturbe un peu la solution en ce sens que le nombre $\bar{n}$ peut varier avec le pH.

b) Un autre paramètre que l'on voulait étudier était la masse moyenne initiale ; nous avons préparé des solutions avec cinq échantillons différents dont les masses moyennes variaient de 24.000 à 80.000 et avec deux fractions d'un de ces échantillons (fractionnement par précipitation).

c) Nous avons essayé de voir l'influence de la température de précipitation ; deux température ont été choisies 4 et 25°C.

d) Deux derniers paramètres entrent en ligne de compte lors de cette étude : la concentration et la durée de précipitation des solutions ; les deux paramètres doivent se combiner de telle façon qu'au temps t :

- il ne reste plus que des molécules agrégées en solution
- la concentration soit suffisamment faible pour que, lors de la désagrégation par chauffage, il ne se produise plus de précipitation.

Pour les premières solutions préparées, nous avons adopté une concentration de 1 %, et pour les suivantes 0,5 %. Le temps de précipitation a été imposé par des servitudes matérielles telles que les possibilités d'utilisation de l'ultracentrifugeuse.

2. Résultats

Ce sont les mêmes sortes de manipulations que celles décrites dans le paragraphe C relatif au fractionnement sur gel : une première expérience de sédimentation est faite pour vérifier qu'il reste bien que des molécules agrégées et pour déterminer la constante de sédimentation, une seconde pour déterminer avec précision la concentration puisque nous nous servons pour des expériences de dispersion optique rotatoire dont on a parlé précédemment dans la quatrième partie, ensuite nous faisons un premier équilibre de sédimentation avec cette solution contenant uniquement des agrégats ; après chauffage, nous refaisons une expérience de sédimentation pour constater que toutes les molécules sont libres, et un équilibre de sédimentation s'il n'y a qu'un seul pic lors de la centrifugation précédente. Les équilibres de sédimentation des solutions qui ont été conservées à 4°C ont été ~~préparées~~ effectués à une température voisine et inférieure à 20°C et, malgré cette différence de température, nous n'avons pas constaté de désagrégation.

Si l'on examine le tableau IX, où nous avons reporté les temps de précipitation, les concentrations, les masses avant et après désagrégation, on s'aperçoit que certaines cases sont vides ; ce sont principalement celles des masses après désagrégation des solutions de plus bas pH et il y a deux raisons à cela :

- dans les solutions dont le temps de précipitation est relativement court et, par conséquent, dont les concentrations sont encore assez élevées, nous voyons apparaître un précipité lors du chauffage

- dans certaines solutions, nous observons que des agrégats se forment par refroidissement à des températures supérieures à 25°C ; nous avons déjà parlé de ce phénomène dans la partie consacrée aux expériences de pouvoir optique rotatoire, effectuées sur des solutions ne contenant que des agrégats.

Tableau IX

Masse moléculaire apparente de solutionsne contenant initialement que des agrégats

Echantillon	pH	Temps de précipitation	concentration	masses moléculaires avant désagrégation	masses moléculaires après désagrégation
CRM 310	4,4	12 mois à 4°C	0,29 %	100.000	
	4,3	8 mois à 4°C	0,19 %	130.000	30.000
	4,2	8½ mois à 4°C	0,20 %	180.000 et 300.00	
	4,3	3 mois à 25°C	0,40 %	240.000	28.000
	4,2	3 semaines à 25°C	0,43 %	350.000	
	4,1	3 semaines à 25°C	0,44 %	560.000	
CRM 276	4,3	9½ mois à 4°C	0,19 %	150.000	20.000
	4,2	9 mois à 4°C	0,35 %	130.000	
	4,3	2 mois à 25°C	0,21 %	220.000	64.000
	4,2	11½ mois à 25°C	0,23 %	150.000	34.000
CRM 542	4,4	6½ mois à 4°C	0,20 %	175.000	27.000
	4,3	6 mois à 4°C	0,17 %	310.000	
	4,1	7 mois à 4°C	0,13 %	350.000 et 2.000.000	
CRM 503	4,3	6 mois à 25°C	0,33 %	150.000 et 490.000	30.000

D'autre part, nous pouvons comparer les valeurs des masses moyennes apparentes après désagrégation aux masse moyennes initiales des échantillons :

Echantillon	Masses après désagrégation	Masse initiale
CRM 310	30.000 28.000	27.000
CRM 276	20.000 64.000 34.000	23.600
CRM 542	27.000	42.000
CRM 503	30.000	72.000

Nous nous attendions à des valeurs de masses après désagrégation bien supérieures aux masses initiales, puisqu'il y a fractionnement par précipitation des molécules dans l'ordre croissant des masses ; or ce n'est pas le cas, sauf pour une solution de l'échantillon CRM 276. L'explication la plus simple que nous puissions proposer est qu'il y aurait hydrolyse et scission des chaînes du polypeptide au cours du temps. Nous avons cherché à confirmer la validité de cette hypothèse.

III. Conclusion

Influence de l'hydrolyse sur l'interprétation des résultats

Avant de conclure sur l'apport de nos résultats à la compréhension du phénomène d'agrégation, nous décrivons les résultats de manipulations tendant à confirmer l'existence du phénomène d'hydrolyse ; à la lumière de ce phénomène, nous reprenons des résultats restés inexploités.

A. Recherche de l'existence du phénomène d'hydrolyse

Pour tenter de prouver l'existence de cette hydrolyse, nous avons préparé à partir, d'un même échantillon, cinq solutions dans NaCl 0,2M à pH 7,3 et mesuré les viscosités intrinsèques : celles-ci sont toutes du même ordre de grandeur et indiquent une masse moléculaire moyenne de 56.500. Ensuite, nous avons essayé de mettre en évidence l'influence de la présence d'agrégats et de la valeur du pH sur le phénomène d'hydrolyse attendu ; nous avons donc porté trois solutions à pH 4,3 à l'aide d'acide acétique ; deux ont été laissées 48 heures en chambre froide et une chauffée ; les deux autres solutions ont été portées à pH 4,15 toujours avec de l'acide acétique, l'une refroidie, l'autre chauffée. Ensuite les cinq solutions sont laissées à température ambiante ; elles précipitent ; au bout d'un mois, nous ajoutons de la soude pour dissoudre le précipité et, pour retrouver les conditions initiales, nous les dialysons contre un tampon 0,2 M NaCl pH 7,3 pendant une semaine. Nous trouvons dans tous les cas une chute de la viscosité indiquant une diminution de masse moléculaire elle est dans quatre cas, de 15 à 17 % et dans le cinquième de 7 %. Ces expériences sont cependant criticables à cause de la dialyse, qui risque de diminuer la concentration par élimination des plus petites masses et qui introduit une incertitude sur la concentration du fait des transvasements.

Nous avons refait le même genre d'expérience, mais de façon un peu différente. Nous avons pris un échantillon dont la masse moyenne initiale est 83.000 ; la solution (0,2 M NaCl pH 7,3) a été portée à pH 4,3 à l'aide d'acide chlorhydrique, ce qui nous a permis de supprimer la dialyse ; au bout de deux mois, nous ramenons le pH à 7,3 et la force ionique en NaCl à 0,2 M. La viscosité intrinsèque nous indique une masse de 69.000, donc une diminution de 16 % ; dans le milieu non tamponné, il y a eu hydrolyse comme dans les milieux tamponnés utilisés auparavant.

Nous pouvons dire qu'il y a hydrolyse des molécules au cours du temps, mais nous ne pouvons pas dire s'il y a une différence entre l'hydrolyse des molécules agrégées et non agrégées. Nous ne pensons pas que ce soit une dégradation enzymatique, car, en particulier, dans la dernière expérience décrite, nous avons ajouté du chloroforme. Nous pensons que cette hydrolyse est due aux ions H^+ ou OH^- de la solution .

Les expériences de détermination de l'existence du phénomène d'hydrolyse ont eu des durées analogues à celles des expériences de précipitation décrites dans la troisième partie et utilisées dans les quatrième et cinquième parties. L'existence de cette hydrolyse permet d'expliquer des anomalies relevées dans trois sortes de manipulations :

1. Dans notre étude des masses moléculaires des fractions précipitées (3e partie paragraphe I C) on obtient à l'aide des courbes de fractionnement une masse moyenne en poids de l'échantillon initial inférieure à celle mesurée par viscosité, ce qui s'explique bien par l'hydrolyse ; il y a principalement coupure des molécules de plus fortes masses qui restent un temps plus long en solution et du même coup il y a diminution de la polydispersité de l'échantillon initial comme nous l'avons constaté.

2. Dans la cinquième partie, au paragraphe IIC (relatif au fractionnement sur gel), nous trouvons des masses plus faibles que prévu pour les fractions de la solution 44 après désagrégation or nous avons déjà indiqué que ces fractions ont été analysées longtemps après la chromatographie de la solution ; là encore, l'hydrolyse permet d'expliquer cette anomalie.

3. Toujours dans la cinquième partie, au paragraphe II D, relatif au fractionnement par précipitation les masses moléculaires mesurées sur des solutions préparées depuis plusieurs mois (2 à 12 mois) et ayant été chauffées (afin de détruire les agrégats) sont inférieures aux masses attendues : l'hydrolyse est, une fois de plus, la cause de cette anomalie.

Nous allons maintenant tenter d'exploiter les résultats qui ont été obtenus ~~au fractionnement~~ par précipitation dans le paragraphe II D de ce chapitre .

B. Essai d'interprétation de résultats

Sur la figure 25 nous avons reporté les résultats les plus complets obtenus à partir de la méthode par fractionnement ~~sur gel~~ par précipitation (voir cinquième partie, paragraphe II D) sur les solutions de l'échantillon CRM 310. Les masses moléculaires obtenues après désagrégation ont pour valeurs 28.000 et 30.000 (voir tableau IX) ce qui ne correspond pas du tout à ce que nous attendions s'il n'y avait pas eu hydrolyse ; nous pouvons quand même déterminer le nombre $\bar{n}$ en supposant que l'ensemble des molécules libres participant aux agrégats à une masse moyenne supérieure à la masse moyenne initiale ; dans le cas des solutions de l'échantillon CRM 310 ayant précipité à 25°C, les trois concentrations sont voisines, et au vu de ces valeurs de concentrations, nous choisissons une valeur arbitraire de la masse moyenne après désagrégation : 40.000 ; d'où les valeurs de $\bar{n}$:

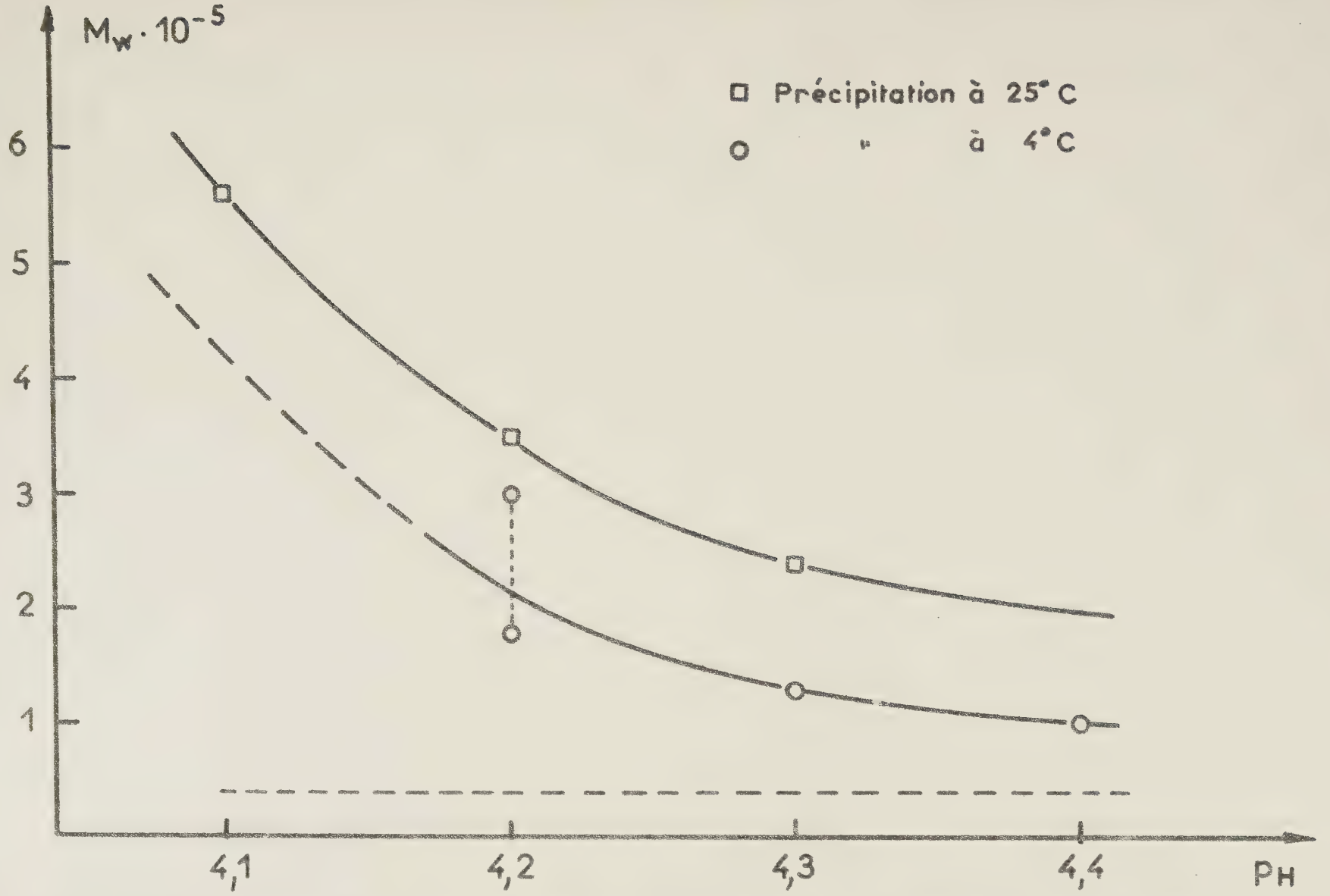


Fig. 25: Masses moléculaires déterminées sur des solutions de l'échantillon CRM 310 après précipitation

pH	$\bar{n}$
4,3	6
4,2	9
4,1	14

Pour l'échantillon 542 précipité à 4°C, on peut aussi avoir une idée de la valeur du nombre $\bar{n}$, si l'on choisit comme masse moyenne après désagrégation 60.000 et comme masse moyenne à pH 4,1 avant désagrégation 680.000 :

pH	$\bar{n}$
4,4	3
4,3	5
4,1	11

Le renseignement important que nous pouvons tirer de ces manipulations est que le nombre moyen $\bar{n}$ de molécules par agrégat n'est pas une constante et qu'il croît quand le pH décroît ; ceci veut dire que les agrégats croissent en volume quand le pH diminue et que leur nombre se multiplie donc pas ou peu.

Revenons à la figure 25, ou nous avons reporté les résultats de solutions de l'échantillon CRM 310 précipitées soit à 4°C soit à 25°C ; le facteur qui est la cause de la différence

des résultats aux deux températures serait plutôt le temps de précipitation : 3 semaines - 3 mois à 25°C et 8 à 12 mois à 4°C ; il y aurait destruction des agrégats au cours du temps. La comparaison des deux masses de solutions agrégées de l'échantillon CRM 276 à 25°C (Tableau IX) nous montre que l'hydrolyse a aussi pour résultat de diminuer la masse moyenne des molécules agrégées, en coupant toutes celles d'un même agrégat sans détruire l'association.

Lors de la détermination de la constante de sédimentation et si nous suivons pendant un temps assez long la progression du pic des agrégats en optique Schlieren, nous observons avec les solutions ayant été gardées très longtemps à la température choisie que ce pic se dédouble en fin de parcours dans la cellule ; par exemple, pour une solution de l'échantillon CRM 310 (pH 4,4, précipitation à 4°C), nous avons tout d'abord $S = 5{,}7.10^{-13}$, puis : $S_1 = 6{,}9.10^{-13}$ et $S_2 = 5{,}3.10^{-13}$. Nous pensons que ce phénomène est dû au fait qu'il y a coupure des polypeptides dans certains agrégats en plusieurs de moindre longueur sans qu'il y ait destruction de l'association, comme nous l'avions déjà constaté en comparant certaines masses moléculaires dans le paragraphe précédent.

Pour des temps d'attente de l'ordre de 2 à 3 mois, il ne semble pas y avoir de coupures complètes d'agrégats. Comparons par exemple les résultats des fractions des solutions 40 et 44 (Tableau VIII) ; les valeurs des masses moléculaires des fractions contenant 100 % de molécules agrégées et provenant de la solution 44 sont supérieures, malgré le temps d'attente, à celles des fractions de même numéro provenant de la solution 40. Ce fait est aussi un argument en faveur de la croissance du nombre $\bar{n}$ quand le pH diminue ; en effet, les fractions que nous avons analysées sont les premières à sortir de la colonne de gel, elles ne

contiennent que des molécules agrégées et elles correspondent aussi aux plus fortes masses des molécules libres, si on admet que le nombre $\bar{n}$ a une valeur constante à un pH donné ; le fait que les masses moléculaires des premières fractions agrégées augmentent quand le pH diminue ne peut donc provenir que d'une augmentation du nombre $\bar{n}$.

Après un temps d'attente supérieur à une année, même le soluté d'une solution contenant initialement des agrégats peut avoir complètement précipité. Dans une solution contenant uniquement des agrégats nous voyons apparaître un précipité, sans que nous observions des molécules libres restant en solution ; nous pensons que s'il y a rupture complète de l'association à un moment donné, les molécules ainsi libérées précipitent presque immédiatement, puisqu'elles ont été hydrolysées lorsqu'elles étaient encore dans l'agrégat.

C. L'agrégation. Mécanisme et modèle

Nos résultats concernant le phénomène d'agrégation des molécules de PALG sont à replacer dans l'optique des travaux de SCHUSTER, JENNINGS et SPACH.

L'agrégation est une association latérale de molécules ou de portions de molécules hélicoïdales, sans qu'intervienne un changement important de la conformation hélicoïdale. A pH 4,4, dans un milieu de salinité 0,1 M, les groupements carboxyles des chaînes latérales du PALG sont ionisés à 20 %[32]. Il apparaît donc qu'à des pH plus bas la répulsion des charges est suffisamment réduite pour que l'agrégation puisse avoir lieu ; le fait que cette réaction dépende beaucoup du pH suggère que cela est bien le cas ; en particulier, le taux d'agrégation augmente quand le pH diminue. Puisque les groupements carboxyles ont des enthalpies

d'ionisation négatives et faibles, il est improbable que l'effet de température soit de changer de manière significative la répulsion due aux charges, qui d'ailleurs, s'accroît quand la température baisse.

L'acide acétique ne joue pas un rôle primordial dans le phénomène d'agrégation. Nous avons fait des mesures de pouvoir optique rotatoire en fonction de la température sur des solutions non tamponnées, à différents pH et ayant séjourné en chambre froide. Nous constatons que l'agrégation a lieu à un pH inférieur à 4,4 dans ce milieu non tamponné alors qu'elle apparaît dès le pH 4,5 dans le tampon contenant de l'acide acétique ; la présence de ce dernier favorise l'agrégation, mais n'est pas indispensable. Nous pouvons en conclure que l'acide acétique ne joue pas le rôle de lien entre molécules agrégées.

Nous ne sommes pas arrivés à mettre en évidence la nature exacte des liaisons intermoléculaires entre les hélices ; seuls quelques essais d'étude infra-rouge en solutions dans l'eau lourde indiquent un léger déplacement de la bande de vibration du groupement C = O appartenant à COOD de 1700 cm^{-1} (35) à 1690 cm^{-1}, ce qui indiquerait une plus forte association de ces groupements entre eux. D'autres remarques peuvent être faites sur le même sujet. L'accroissement soudain du pK apparent des groupes carboxyles (5,28,51-54), à bas pH quand les molécules de PALG s'agrègent, indique que ces groupes sont impliqués par des liaisons hydrogènes dans les agrégats. La juxtaposition des chaînes adjacentes, qui forment une espèce de spirale le long de l'axe de chaque hélice, conduit à un fort degré de liaisons hydrogènes carboxyle-carboxyle. De telles liaisons sont assez stables et contribuent à la stabilité des agrégats aussi longtemps que la structure secondaire reste intacte et que la charge des molécules reste faible.

Il y a un certain degré de spécifité dans le phénomène d'agrégation puisqu'il s'arrête après que plusieurs molécules se soient rassemblées et que, initialement, on ne distingue pas de stade intermédiaire. Nous avons montré que le nombre moyen $\bar{n}$ de molécules par agrégat a des valeurs limitées qui croissent quand le pH diminue ou, de manière plus certaine, que la masse moyenne des molécules agrégées augmente quand le pH diminue. Ceci n'est pas en accord avec le phénomène de "cristallisation fractionnée" proposé par JENNINGS, SCHUSTER et SPACH pour rendre compte du fait qu'ils avaient remarqué que les molécules devaient s'associer par tailles identiques. En effet, supposons que nous partons d'une solution de pH 4,4 dans laquelle il y a déjà des molécules agrégées ; ces dernières sont les molécules de plus fortes masses de l'échantillon ; quand nous diminuons le pH, seules des molécules de masses plus faibles sont encore disponibles pour venir grossir les agrégats déjà formés, et les tailles des molécules venant s'ajouter ne sont pas du tout identiques à celles du "noyau" de l'agrégat. Nous pensons qu'il y a une sorte de nucléation des agrégats dans le domaine de pH 4,5 4,4 qui peut être assimilée à une cristallisation fractionnée et que l'agrégation se développe à pH bas par l'association autour de noyau de molécules de différentes masses. Cette hypohtèse n'est pas en contradiction avec les résultats des auteurs cités ci-dessus, car leurs mesures de viscosité spécifique indiquant que l'association est latérale n'ont été effectuées qu'au pH 4,4.

Plusieurs modèles d'agrégats d'hélices ont été proposé, par exemple les structures dénommées "coiled-coil" de trois[55] ou de sept unités[56]. L'existence de telles structures dans les solutions concentrées de polypeptides synthétiques est discutée dans une revue assez récente[57]. Dans les solutions concentrées de PALG dans le diméthylformamide, les expériences de diffraction des rayons X ont montré l'existence de différentes phases[58] ;

certaines d'entre elles sont des arrangements d'hélices α , tandis qu'à des concentrations supérieures à 65 % il y a arrangement tétragonal d'hélices ω (l'hélice ω est une déformation topologique de l'hélice α). Ce sont les seuls types d'agrégats décrits jusqu'à maintenant.

CONCLUSION GENERALE

Le but de ce travail était de contribuer à mettre en évidence certaines conformations de l'acide α -poly-L-glutamique.

Nous avons d'abord montré par analyse chromatographique que les phénomènes d'agrégation et de précipitation sont distincts, et que le premier affecte les plus fortes masses moléculaires d'un échantillon, tandis que le second concerne les faibles masses.

La précipitation spontanée des molécules au cours du temps est un fractionnement ; les masses moléculaires déposées croissent avec le temps.

La structure secondaire du précipité formé n'est pas unique et c'est ce qui fait que nous ne pouvons pas proposer un modèle précis de structure ; néanmoins, nous pouvons dire que l'une des formes structurales en présence est identique à la forme cristalline des échantillons bruts de PALG et que l'autre est un ensemble de chaînes étirées liées par l'intermédiaire des groupes carboxyles des chaînes latérales.

Le mécanisme du phénomène d'agrégation n'a pas été entièrement élucidé. Notre principal résultat , acquis malgré les difficultés engendrées par l'existence de l'hydrolyse, est que la masse moyenne des agrégats augmente quand le pH diminue. Il faudrait vérifier si l'association des molécules est latérale à tous les pH, ce qui permettrait alors de confirmer notre interprétation. Nous pensons qu'il se forme d'abord un noyau de molécules hélicoïdales de tailles identiques auquel viendraient s'accrocher, au fur et à mesure que le pH décroît, des molécules hélicoïdales de tailles différentes.

Le phénomène inverse, c. à d. la désagrégation des molécules de PALG au cours du temps, s'explique par l'hydrolyse ; il y a coupure des molécules qui sont agrégées, puis coupure complète de certains agrégats. A un moment donné, l'association

se rompt et les molécules précipitent, puisque nous ne voyons jamais apparaître de molécules libres au cours du temps.

Pour avoir une connaissance précise du mécanisme d'agrégation, il reste encore à déterminer le nombre moyen $\bar{n}$ de molécules par agrégats. Les méthodes que nous avons employées n'ont pas donné de résultats très sûrs à cause du phénomène d'hydrolyse. Néanmoins, nous pensons que la méthode de fractionnement du polymère brut sur gel pourrait être reprise, à condition d'opérer avec des quantités plus grandes de PALG sur des colonnes de volume plus important, et à condition de réduire au minimum les temps d'attente des solutions fractionnées de façon à limiter l'hydrolyse. Ce n'est qu'une fois ces conditions remplies que l'on pourra poursuivre l'étude de l'agrégation avec la détermination du nombre $\bar{n}$ et la vérification de l'association latérale des molécules.

BIBLIOGRAPHIE

1. T.M. SCHUSTER, Biopolymers, 3, 681 (1965)
2. a) B.R. JENNINGS, G. SPACH, H. BENOIT et T.M. SCHUSTER, Preprint 562, IUPAC Symposium on Macromolecular Chemistry, Prague (1965)
   b) B.R. JENNINGS, G.SPACH et T.M. SCHUSTER, Biopolymers, 6, 635 (1968).
   c) T.M. SCHUSTER, B.R. JENNINGS et G. SPACH, Symmetry and Function of Biological Systems at the Macromolecular Level, Nobel Symposium 11, A. Engström et B. Strandberg, Ed. Almqvist et Wiksell, Stockholm, 1969, p. 213.
3. P. DOTY, A.WADA, J.T. YANG et E.R. BLOUT, J.Polym.Sci., 23, 851, (1957)
4. M. IDELSON et E.R. BLOUT, J.Am.Chem.Soc. , 80, 4631 (1958).
5. A. WADA, Mol.Physics, 3, 409 (1960).
6. J. APPLEQUIST et J.L. BRESLOW, J.Am.Chem.Soc., 85, 2869 (1963).
7. K.K. YAMAOKA, Biopolymers, 2, 219 (1964)
8. P. APPEL et J.T. YANG, Biochemistry, 4, 1244 (1965).
9. J.Y. CASSIM et J.W. TAYLOR, Biophys. J., 5, 573 (1965).
10. E. IIZUKA et J.T. YANG, Biochemistry, 4, 1249, (1965).
11. A.B. ZESIN, N.F. BAKEEV et P.V. KOZLOV, Preprint 120, IUPAC Symposium on Macromolecular Chemistry, Prague (1965).
12. E. SCOFFONE, E. PEGGION, A. COSANI, et M. TERBOJEVICH, Biopolymers 3, 535 (1965).
13. R.D. LUNDBERG et P. DOTY, J.Am.Chem.Soc. 79, 3961, (1957).
14. C.E. HALL et P. DOTY, J.Am.Chem.Soc., 80, 1269, (1958).
15. H. FEIGENBAUM, Communication personnelle
16. A. YARON et A. BERGER, Biochem. et Biophys.Acta, 107, 307 (1965).
17. R. LEDGER et F.H.C. STEWART, Aust.J.Chem., 18, 1477 (1965).
18. W.E. HANBY, S.G. WALEY et J. WATSON, J.Chem.Soc. (London), 1950, 3239.
19. E. TASCHNER, A. CHIMIAK, J.F. BIERNAT, C. WASIELEWSKI et T. SOKOLOWSKA, Liebigs Ann.Chem., 663, 188 (1963).
20. S. GOLDSCHMIDT et C. JUTZ, Chem.Ber., 86, 1116 (1953).
21. M. BERGMANN et L. ZERVAS, Chem.Ber., 65, 1192 (1932).
22. W.J. Le QUESNE et G.T. YOUNG, J.Chem.Soc. (London), (1950), 1954.

23. G.H.L. NEFKENS et R.J.F. NIVARD, Recueil des Trav.Chim. des Pays-Bas, T. 83, n° 2,(Févr. 1964), p. 199.
24. H. SACHS et E. BRAND, J.Am.Chem.Soc., 75, 4610 (1953).
25. R.W. ROESKE, Chem.and Ind., 1121 (1959) et J.Org.Chem., 28, 1251 (1963).
26. E. TASCHNER, A. CHIMIAK, B. BATOR et T. SOKOLOWSKA, Ann.Chem., 646, 134 (1961).
27. G. LOSSE, H. JESCHKEIT et W. LANGENBECK, Chem.Ber., 96, 204, (1963).
28. R.L. SNIPP, W.G. MILLER et R.E. NYLUND, J.Am.Chem.Soc., 87, 3547, (1965).
29. Z. GRUBIZIC, L. REIBEL et G. SPACH, C.R.Acad.Sci., Paris , 264, 1690, (1967).
30. J.T. YANG et T. SAMEJIMA, J.Biol.Chem., 238, 3262 (1961).
31. W. MOFFITT et J.T. YANG, Proc.Nat.Acad.Sci., U.S., 42, 596, (1956).
32. I. MICHAELI, Preprint Colloque IUPAC Toronto, A 3-2 (1968).
33. C. MUSSA I.V. , J.Polym.Sci., 26, 67 (1957), et J.Polym.Sci., 28, 587, (1958).
34. L.J. BELLAMY, The Infrared-red Spectra of Complex Molecules. S^{d}. Ed. a) p. 207
    b) p. 226
    c) p. 15
    d) p. 164
    e) p. 172
35. H. LENORMANT, A. BAUDRAS et E.R. BLOUT, J.Am.Chem.Soc., 80, 6191 (1958).
36. E.R. BLOUT et M. IDELSON, J.Am.Chem.Soc., 78, 497 (1956).
37. E.M. BRADBURY, C. CRANE-ROBINSON, H. GOLDMAN et H.W.E. RATTLE, Biopolymers, 6, 851 (1968).
38. C.H. BAMFORD, A. ELLIOT et W.E. HANBY, Synthetic Polypeptides, Academic Press Inc., N.Y., 1956, Chapitre V.
39. M. ASAI, M. TSUBOI, T. SHIMANOUCHI et S.I. MIZUSHIMA, J.Phys. Chem., 59, 322, (1955).
40. T. MIYAZAWA, Poly-α -Amino Acids, Volume 1, G.D. Fasman, Ed. M. Dekker Inc., N.Y. (1967).

41. A. ELLIOT, R.D.B. FRASER, T.P. Mac RAE, I.W. STAPLETON et E. SUZUKI, J.Mol.Biol., 9, 10 (1964).
42. P.V. HUONG, Communication personnelle.
J. LASCOMBE et M.L. JOSIEN, J.Chim.Phys., 65, 152, (1968).
43. H.D. KEITH, G. GIANNONI et F.J. PADDEN Jr. Biopolymers, 7, 775, (1965).
44. a) D.H. EVERETT et W.I. WHITTON, Trans.Faraday Soc., 48, 749 (1952).
b) D.H. EVERETT et F.W. SHMITH, Trans.Faraday Soc., 50, 187, (1954).
c) D.H. EVERETT, Trans.Faraday Soc., 50, 1077 (1954).
d) D.H. EVERETT, Trans.Faraday Soc., 51, 1551 (1955).
45. C. TANFORD, J.Am.Chem.Soc., 84, 1747 (1962).
46. Y. TOMIMATSU, L. VITELLO, et W. GAFFIELD, Biopolymers, 4, 653 (1966).
47. E. SCHECHTER, J.P. CARVER et E.R. BLOUT, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 51, 1029, (1964).
48. G.D. FASMAN, C. LINDBLOW et E. BODENHEIMER, Biochemistry, 3, 155, (1964).
49. J.P. JOHNSON et A.G. OGSTON, Trans.Faraday Soc., 42, 789 (1946).
50. R. TRAUTMAN, V.N. SCHUMAKER, W.F. HARRINGTON et H.K. SCHACHMAN, J. Chem.Phys., 22, 555, (1954).
51. M. NAGASAWA et A. HOLTZER, J.Am.Chem.Soc., 86, 538, (1964).
52. R.E. NYLUND et W.G. MILLER, J.Am.Chem.Soc., 87, 3537 (1965).
53. J. HERMANS, J.Phys.Chem., 70, 510 (1966).
54. J. HERMANS, J.Am.Chem.Soc., 88, 2418 (1966).
55. a) F.H.C. CRICK, Nature, 170, 882, (1952).
b) F.H.C. CRICK, Acta Crystallog., 6, 689, (1953).
56. L. PAULING et R.B. COREY, Nature, 171, 59 (1953).
57. P. SALUDJAN et V. LUZZATI, Poly-α-Amino Acids, Volume 1, G.D. Fasman, Ed., M. Dekker Inc., N.Y. (1967).
58. P. SALUDJAN, C. De LOZE et V. LUZZATI, C.R.Acd.Sci., Paris, 256, 4514, (1963).

La deuxième partie de cette thèse constitue le sujet d'une publication déjà parue : G. SPACH et D. CONSTANTIN, Biopolymers, 6, 653 (1968).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

- Rappel des travaux antérieurs 2
- Présentation du travail 5

PREMIERE PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

I) Préparation et caractérisation des échantillons de PALG 7

II) Essais d'obtention du PALG de forte masse moléculaire et faible polydispersité 8

A) Changement des conditions de débenzylation 9

1) durée de traitement
2) température
3) lumière

B) Choix d'un autre ester du PALG 10

1) Préparation du γ -glutamate de p-méthoxybenzyle
2) Préparation du γ -glutamate de t-butyle méthodes indirectes
3) Essai de préparation du γ -glutamate de p -nitophényle.
4) Conclusion

C) Essais de fractionnement 14

III) Préparation des solutions 14

a) solutions tamponnées
b) solutions non tamponnées

IV) Techniques Expérimentales 16

A) Pouvoir optique rotatoire 16
B) Chromatographie sur gel 17
C) Ultracentrifugation 18
D) Rayons X 19
E) Spectrographie Infra-rouge 19